

VOL I

Estudos em Ciências Agrárias e Ambientais

Eduardo Spers
(Organizador)



EDITORA
ARTEMIS

2024

VOL I

Estudos em Ciências Agrárias e Ambientais

Eduardo Spers
(Organizador)



EDITORA
ARTEMIS

2024



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. Eduardo Eugênio Spers
Imagem da Capa	Bruna Bejarano, Arquivo Pessoal
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. Guillermo Julián González-Pérez, *Universidad de Guadalajara, México*
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 Godinez, Universidad Autónoma de Baja California, México
Prof. Dr. Juan Carlos Cancino Diaz, 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. Juan Porras Pulido, *Universidad Nacional Autónoma de México, 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 Rodriguez, *Universidad Santiago de Compostela, Espanha*
Prof. Dr. Manuel Simões, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal
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 da Luz Vale Dias – Universidade de Coimbra, Portugal
 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 MªGraça Pereira, Universidade do Minho, Portugal
 Prof.ª Dr.ª Maria Gracinda Carvalho Teixeira, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil
 Prof.ª Dr.ª María Guadalupe Vega-López, *Universidad de Guadalajara, México*
 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. Dr. Melchor Gómez Pérez, Universidad del Pais Vasco, Espanha
 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. Sérgio 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 Susana Álvarez Otero – Universidad de Oviedo, Espanha
 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 Ciências Agrárias e Ambientais I [livro eletrônico] /
Organizador Eduardo Eugênio Spers. – Curitiba, PR: Artemis,
2024.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

Edição bilingue

ISBN 978-65-81701-19-2

DOI 10.37572/EdArt_300724192

1. Ciências agrárias – Pesquisa – Brasil. 2. Meio ambiente.
3. Sustentabilidade. I. Spers, Eduardo Eugênio.

CDD 630

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422



APRESENTAÇÃO

O campo das ciências agrárias e ambientais está em constante evolução, refletindo a necessidade crescente de entender e gerenciar os recursos naturais e a produção agrícola de maneira sustentável.

O primeiro volume desta nova coletânea “**Estudos em Ciências Agrárias e Ambientais**”, reúne 12 capítulos de destacados pesquisadores, oferece uma visão abrangente das investigações mais recentes em quatro eixos cruciais e complementares: ciências agrárias, ciências dos animais, ciências dos alimentos e ciências ambientais.

No eixo **Estudos em Ciências Agrárias**, os artigos exploram a variabilidade genética e os métodos de cultivo que podem influenciar a produtividade e a qualidade das culturas. O estudo da heterose em sementes híbridas de milho azul (cap. 1) revela como características superiores podem ser obtidas por meio de cruzamentos específicos. Adicionalmente, a análise do potencial genotécnico de híbridos e variedades sintéticas de milho azul (cap. 2) demonstra a importância da adaptação regional para maximizar a produtividade. A pesquisa sobre a manipulação de plantas de limão persa (cap. 3) e a propagação vegetativa do lúpulo (cap. 4) trazem insights sobre práticas de cultivo que podem otimizar a produção.

O eixo **Estudos em Ciências dos Animais** foca na saúde e na eficiência dos sistemas de produção animal. A detecção de imunoglobulinas contra *Anaplasma marginale* (cap. 5) é essencial para a compreensão das doenças bovinas, enquanto a avaliação da eficiência do uso de nutrientes em bovinos (cap. 6) pode melhorar a produtividade e a sustentabilidade das operações de pecuária. O estudo sobre a seroprevalência de *Mycobacterium avium* subespécie paratuberculosis em ovinos (cap. 7) oferece informações valiosas para o controle de doenças em sistemas de produção ovina.

Os artigos do terceiro eixo, **Estudos em Ciências dos Alimentos**, discutem a inovação e a funcionalidade na produção de alimentos. O potencial das sementes de *Moringa oleifera* (cap. 8) é explorado, destacando seus benefícios nutricionais e aplicações alimentares. Além disso, a dinâmica do status total de antioxidantes ao longo do processo de produção de vinho (cap. 9) revela como a qualidade do vinho pode ser monitorada e aprimorada, desde o suco até o produto final.

Finalmente, o eixo temático **Estudos em Ciências Ambientais** aborda questões cruciais relacionadas ao meio ambiente e à conservação. A investigação sobre a doença de manchas marrons e suas interações com hospedeiros (cap. 10) oferece uma visão sobre a gestão de doenças em agroecossistemas. Os avanços na conservação dos recursos genéticos de baunilha no México (cap. 11) são discutidos, evidenciando esforços para preservar espécies ameaçadas e a pesquisa sobre macrofauna bentônica em riachos (cap. 12) demonstra a importância dos organismos do solo para a saúde dos ecossistemas aquáticos.

Este livro não só apresenta pesquisas inovadoras e relevantes, mas também promove uma integração de conhecimentos que é vital para enfrentar os desafios contemporâneos nas ciências agrárias e ambientais. Acreditamos que as descobertas aqui compiladas contribuirão significativamente para o avanço da ciência e para a implementação de práticas mais sustentáveis e eficientes.

Desejo a todos uma proveitosa leitura!

Eduardo Eugênio Spers

SUMÁRIO

ESTUDOS EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CAPÍTULO 1.....1

EXPRESIÓN DE LA HETEROSIS EN SEMILLAS HÍBRIDAS DE MAÍZ AZUL

Germán Fernando Gutiérrez-Hernández

José Luis Arellano-Vázquez

Luis Fernando Ceja-Torres

Martín Filiberto García-Mendoza

Elpidio García-Ramírez

Estela Flores-Gómez

Patricia Vázquez-Lozano

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3007241921

CAPÍTULO 2.....10

POTENCIAL GENOTÉCNICO DE HÍBRIDOS Y VARIEDADES SINTÉTICAS DE MAÍZ AZUL CON ADAPTACIÓN A VALLES ALTOS CENTRALES DE MÉXICO

José Luis Arellano-Vázquez

Germán Fernando Gutiérrez-Hernández

Luis Fernando Ceja-Torres

Martín Filiberto García Mendoza

Elpidio García Ramírez

Estela Flores-Gómez

Patricia Vázquez-Lozano

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3007241922

CAPÍTULO 3.....18

COMPORTAMIENTO DE LA MANIPULACIÓN DE PLANTAS INJERTADAS DE LIMÓN PERSA DURANTE LA ETAPA DE PREPRODUCCIÓN DE PLANTA

Pablo Ulises Hernández Lara

Diana Rubi Ramos López

Felipe Mirafuentes Hernández

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3007241923

CAPÍTULO 4.....24

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DO LÚPULO: EFEITO DO COMPRIMENTO DE ESTACAS E DOSES DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO NA PRODUÇÃO DE MUDAS

Dalva Paulus

Mateus Dall'Agnol

Dislaine Becker

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3007241924

ESTUDOS EM CIÊNCIAS DOS ANIMAIS

CAPÍTULO 5..... 35

DETECCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS CONTRA *ANAPLASMA MARGINALE* EN BOVINOS DE TRES ESTADOS DE MÉXICO

Elizabeth Salinas Estrella

Mayra Elizeth Cobaxin Cárdenas

Roberto Omar Casteñada Arriola

Itzel Amaro Estrada

Sergio Darío Rodríguez Camarillo

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3007241925

CAPÍTULO 6.....42

NUTRIENT USE EFFICIENCY EVALUATION OF BEEF CATTLE FEEDLOT

Andrea Wingartz Otaduy

Rafael Olea Pérez

José Luis Dávalos Flores

María Edna Álvarez Sánchez

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3007241926

CAPÍTULO 7..... 49

SEROPREVALENCIA A *Mycobacterium avium* SUBESPECIE *paratuberculosis* POR RAZAS EN OVINOS EN TRES UNIDADES DE PRODUCCIÓN

José Vicente Velázquez-Morales

Marco Antonio Santillán-Flores

Dionicio Córdova-López

Juan Salazar-Ortiz

Ramón Soriano-Robles

Edgar Valencia-Franco

José Luis Ponce-Covarrubias

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3007241927

ESTUDOS EM CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS

CAPÍTULO 8.....55

ALIMENTOS À BASE DE SEMENTES DE *Moringa oleifera*

Adèle Gautier

Carla Margarida Duarte

Isabel de Sousa

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3007241928

CAPÍTULO 9.....78

DYNAMICS OF TOTAL ANTIOXIDANT STATUS THROUGHOUT THE WINE PRODUCTION PROCESS: FROM JUICE TO FINISHED NON-ALCOHOLIC WINE PRODUCT

Andrejs Skesters

Anna Lece

Dmitrijs Kustovs

Gundega Gerke

Daina Garokalna

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3007241929

ESTUDOS EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

CAPÍTULO 10..... 88

INSIGHTS INTO BROWN SPOT DISEASE: CAUSAL AGENTS AND HOST INTERACTIONS IN AGROECOSYSTEMS

Justino Sobreiro

Cláudia Sofia Batalha Neto

 https://doi.org/10.37572/EdArt_30072419210

CAPÍTULO 11..... 101

AVANCES EN EL RESCATE Y CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS GENÉTICOS DE VAINILLA EN MÉXICO

Juan Hernández Hernández

Esmeralda J. Cruz Gutiérrez

 https://doi.org/10.37572/EdArt_30072419211

CAPÍTULO 12 110

THE ROLE OF BENTHIC MACROFAUNA IN HEADWATER STREAMS, CHAPADA DOS
VEADEIROS, CENTRAL BRAZIL

Maria Júlia Martins Silva

Claudia Padovesi Fonseca

 https://doi.org/10.37572/EdArt_30072419212

SOBRE O ORGANIZADOR..... 120

ÍNDICE REMISSIVO 121

CAPÍTULO 1

EXPRESIÓN DE LA HETEROSIS EN SEMILLAS HÍBRIDAS DE MAÍZ AZUL¹

Data de submissão: 03/07/2024

Data de aceite: 23/07/2024

Germán Fernando Gutiérrez-Hernández

Instituto Politécnico Nacional
Unidad Profesional
Interdisciplinaria de Biotecnología
Av. Acueducto s/n.
La Laguna Ticomán. C. P. 07340
Ciudad de México, México
<https://orcid.org/0000-0003-3312-3747>

José Luis Arellano-Vázquez

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Campo Experimental
Valle de México. C. P. 56250
Coatlinchán, Estado de México, México
<https://orcid.org/0000-0002-2231-2940>

Luis Fernando Ceja-Torres

Instituto Politécnico Nacional
Centro Interdisciplinario de
Investigación para el Desarrollo
Integral Regional
Unidad Michoacán
Justo Sierra 28. C. P. 59510
Jiquilpan, Michoacán, México
<https://orcid.org/0000-0002-8397-0701>

Martín Filiberto García-Mendoza

Instituto Politécnico Nacional
Unidad Profesional
Interdisciplinaria de Biotecnología
Av. Acueducto s/n.
La Laguna Ticomán. C. P. 07340
Ciudad de México, México

Elpidio García-Ramírez

Universidad Nacional
Autónoma de México
Facultad de Química
Av. Universidad y Copilco. C.P. 04510
Ciudad de México, México

Estela Flores-Gómez

Instituto Politécnico Nacional
Unidad Profesional
Interdisciplinaria de Biotecnología
Av. Acueducto s/n.
La Laguna Ticomán. C. P. 07340
Ciudad de México, México
<https://orcid.org/0000-0002-4634-455X>

Patricia Vázquez-Lozano

Instituto Politécnico Nacional
Unidad Profesional
Interdisciplinaria de Biotecnología
Av. Acueducto s/n.
La Laguna Ticomán. C. P. 07340
Ciudad de México, México
<https://orcid.org/0000-0002-5945-6307>

¹ Derivado del artículo: <https://doi.org/10.32854/agrop.v16i11.2730>

RESUMEN: La heterosis es un proceso biológico aprovechado extensivamente en el mejoramiento de las plantas cultivadas, consiste en que la descendencia de dos progenitores no emparentados entre sí, los supera en la característica de interés. En maíz se ha estudiado profusamente este fenómeno en morfología de planta o rendimiento de grano, pero escasamente en semillas. El objetivo del presente trabajo fue cuantificar la heterosis en características físicas y fisiológicas de semillas de las cruzas parentales (simple y trilineal) de un híbrido de maíz azul. Se utilizaron semillas de los genotipos que conforman el híbrido trilineal de maíz HAZUL 10E: Tres líneas endogámicas y cruza simple y trilineal. El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones. Se evaluaron características físicas de las semillas (peso, ancho, grosor, largo, volumen, densidad y los cocientes ancho/largo y grosor/largo) y fisiológicas (plántulas normales y anormales, semillas inertes y longitudes y materia seca de plúmula, radícula y total). Se determinó la heterosis para cada variable y se probaron las diferencias entre ambas cruza con la t de Student. La heterosis fue más alta en la cruza simple que en la trilineal. En la cruza simple la heterosis mayor correspondió a materia seca de plúmula, de radícula y la total; seguidas de peso y volumen de semilla; mientras que, en la trilineal, los valores más altos correspondieron a plántulas normales y longitud y biomasa de radícula y la total. Las variables determinantes de la forma de semilla, la formación de plántulas normales y la elongación de la radícula, respondieron mejor a la hibridación en la cruza trilineal. Se concluyó que, en la cruza simple, la heterosis incrementó las dimensiones de semilla y la biomasa acumulada en las plántulas; mientras que, en la trilineal, incidió sobre la forma de semilla y las plántulas normales producidas.

PALABRAS CLAVE: Vigor híbrido. Maíz pigmentado. Germinación de semilla. Descriptores de semilla.

EXPRESSION OF HETEROSIS IN BLUE CORN HYBRID SEEDS

ABSTRACT: Heterosis is a biological process that is widely used in crop improvement. It consists of the offspring of two unrelated parents outperforming them in the trait of interest. This phenomenon has been extensively studied in maize regarding plant morphology or grain yield, but scarcely in seeds. The objective of this work was to quantify heterosis in physical and physiological characteristics of seeds from parental crosses (simple and trilinear) of a blue corn hybrid. Seeds of the genotypes that make up the HAZUL 10E maize hybrid were used: Three inbred lines and single and trilinear crosses. The experimental design was completely randomized with three replications. Physical characteristics of the seeds (weight, width, thickness, length, volume, density, and the width/length and thickness/length ratios) and physiological characteristics (normal and abnormal seedlings, inert seeds, and plumule, radicle, and total lengths and dry matter) were evaluated. Heterosis was determined for each variable and differences between both crosses were tested with the Student t-test. Heterosis was higher in the simple cross than in the trilinear cross. In the simple cross, the highest heterosis corresponded to plumule, radicle, and total dry matter; followed by seed weight and volume; while in the trilinear cross, the highest values corresponded to normal seedlings, and radicle and total length and biomass. The variables determining seed shape, the formation of normal seedlings, and radicle elongation, responded better to hybridization in the trilinear cross. It was concluded that, in the simple cross, heterosis increased seed dimensions and accumulated biomass in seedlings. In contrast, in the trilinear cross, the heterosis affected seed shape and the normal seedlings produced.

KEYWORDS: Hybrid vigor. Pigmented corn. Seed germination. Seed descriptors.

1 INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es el cultivo más importante en el mundo por área sembrada y por volumen de producción (FAO-STAT, 2022). En el 2021 se sembraron en México 7.4 millones de hectáreas con esta especie y se cosecharon 27.5 millones de toneladas de grano (SIAP, 2022). En particular, el maíz azul es relevante por su utilización amplia en la cocina tradicional mexicana (tortillas, tlacoyos, sopes, etc.) (Arellano y Rojas, 2015), debido a su color exótico y sus atributos de sabor, textura y bondades nutraceuticas (Arellano *et al.*, 2013).

En la Mesa Central de México (estados de México, Puebla, Tlaxcala y Ciudad de México) se siembran, con variedades criollas, tecnología tradicional y condiciones de temporal, 150 mil hectáreas con maíz azul y se cosechan 300 mil toneladas de grano, las cuales no satisfacen la demanda por este alimento.

El rendimiento actual de grano de maíz azul es de 1.9 ton ha⁻¹ (SIAP, 2022) y se considera factible elevarlo significativamente mediante el uso de híbridos (Lee y Tollenaar, 2007) desarrollados con base en la variabilidad genética disponible en la región de interés (Arellano *et al.*, 2014).

En el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) se desarrollaron híbridos experimentales de maíz azul para Valles Altos (2400-2800 msnm), con rendimientos de 6.4 a 8.2 ton ha⁻¹, de los cuales destacó el HAZUL10 por producir 8.2 ton ha⁻¹, en promedio de ambientes de alta, mediana y baja productividad (Arellano *et al.*, 2015).

La hibridación se describió a principios del siglo XX (Shull, 1909), desde entonces ha sido exitosa para el mejoramiento de maíz y actualmente sigue aplicándose para obtener híbridos que coadyuven a satisfacer la demanda mundial de este grano (MacRobert *et al.*, 2014). Con la hibridación, la F₁ expresa dimensiones morfológicas mayores y mejor rendimiento de grano que los progenitores endogámicos no emparentados (Guerrero-Guerrero *et al.*, 2014), en una magnitud dependiente de su bagaje genético y del ambiente de producción. Las respuestas anteriores son causadas por la heterosis, un fenómeno complejo y poco esclarecido, pero utilizado ampliamente en el mejoramiento de maíz y de otros cultivos básicos.

El objetivo del presente trabajo fue cuantificar la heterosis en características físicas y fisiológicas de semillas de las cruzas parentales (simple y trilineal) de un híbrido de maíz azul.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL GENÉTICO

Se utilizaron semillas de los genotipos parentales del híbrido experimental de maíz azul HAZUL 10E: Las líneas endogámicas A (BXCC-54-11-1-1-1), B (BXCC-5-9-6) y C (NXOAX-19-5-1-1-2) y las cruza simple D (BXCC-54-11-1-1-1) x (BXCC-5-9-6) y trilineal E [(BXCC-54-11-1-1-1) x (BXCC-5-9-6)] x (NXOAX-19-5-1-1-2). El híbrido se desarrolló en el Programa de Maíz Azul del Campo Experimental Valle de México del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CEVAMEX, INIFAP).

2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

Peso de semillas (PS), se pesaron 100 semillas (mg) en balanza analítica (AE Adam P W 184, precisión 0.1 mg). La anchura (AS), el grosor (GS) y la longitud (LS) de las semillas se midieron (mm) con vernier digital (Mitutoyo CD-6 CSX); además, se calcularon el volumen (VS, mm³), la densidad relativa (DRS, g/cm³) y las relaciones AS/LS y GS/LS de las semillas.

2.3 CARACTERÍSTICAS GERMINATIVAS

2.3.1 Germinación normal

Se utilizó la prueba de germinación estándar (ISTA, 2022). Las semillas se colocaron entre toallas de papel saturadas de humedad en cámara de germinación a 25 °C y 100 % h. r. A los siete días de incubación se contabilizaron (%) las plántulas generadas con su morfología completa y libre de patógenos (PN), las plántulas anormales (PA) y las semillas muertas (SI).

2.3.2 Desarrollo de plántulas

En las plántulas normales se midieron (mm) las longitudes de plúmula (LP), radícula (LR) y la total (LT); estas estructuras se secaron en estufa (80 °C, 4 d) y se determinó (mg) su peso seco (PSP, PSR y PST, respectivamente).

2.4 ESTIMACIÓN DE LA HETEROSIS

La heterosis (H, %) se calculó respecto al promedio de progenitores de la cruce: $H = [(F_1 - PP) / PP] * 100$; donde F_1 = Valor de la característica en la cruce, PP = Promedio de la característica en los progenitores de la cruce (Arellano *et al.*, 2017).

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se probó la significancia de los tratamientos con un análisis de varianza y las medias de los genotipos (tratamientos) se compararon mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Se empleó la prueba de datos apareados de Student para probar la significancia ($P \leq 0.05$ y $P \leq 0.01$) de las diferencias de la heterosis entre y dentro de cruza. El valor de estas diferencias se multiplicó por (-1) para indicar el sentido de la variación en las variables. El procesamiento estadístico de los resultados se hizo con el programa SAS (ver. 9.2).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las variables de respuesta empleadas en el presente estudio resultaron estadísticamente significativas en el análisis de varianza (datos no mostrados), esto evidenció la heterogeneidad de la expresión de las características medidas en los genotipos (tratamientos). En la comparación estadística de las medias de tratamientos (Cuadro 1), se obtuvo que los descriptores físicos de la semilla PS, VS, LS, AS y GS, fueron inferiores ($P \leq 0.05$) en el tratamiento C, intermedios en A y B, y superiores en D y E. En los aspectos fisiológicos, los tratamientos C, D y E fueron superiores ($P \leq 0.05$) en DRS, AS/LS y GS/LS. Los tratamientos A, B, D y E tuvieron la cantidad menor ($P \leq 0.05$) de SI y el C la más alta.

En las variables implicadas en el desarrollo de las plántulas, la longitud de plúmula (LP) mínima fue para C y la superior para A ($P \leq 0.05$), mientras que E alcanzó los resultados mayores ($P \leq 0.05$) en LR, LT, PSR y PST, y D en PSP.

En PSR y PST, de nuevo se apreció la superioridad de los tratamientos D y E; mientras que, el valor mayor de PSP fue para el D y el menor para C.

Los tratamientos D (cruza simple) y E (cruza trilineal) tuvieron dimensiones físicas (PS, VS, LS, AS y GS) y cantidad de materia seca de plántulas (PSP, PSR y PST) mayores ($P \leq 0.05$) que los tratamientos A, B y C (líneas endogámicas) (Cuadro 1). El desempeño inferior de las líneas con respecto a las cruza en las variables descritas se explica porque expresaron los efectos genéticos de la homocigosis o endogamia, que conllevan reducciones de rendimiento, porte de planta, tamaño y volumen y peso de semilla (Wuhaib *et al.*, 2017), que son caracteres dominantes; en contraparte, las cruza manifestaron la heterosis o vigor híbrido, proceso metabólico cuya repercusión fenotípica es que la descendencia híbrida supera el promedio de sus progenitores en algunas características (Nepir *et al.*, 2015), las cuales en el presente trabajo fueron las mediciones físicas PS, VS, LS, AS y GS y las fisiológicas PSP, PSR y PST.

Cuadro 1. Comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$) para las variables evaluadas en semillas de los genotipos parentales del HAZUL 10E.

Variable	Genotipos					Tukey
	A	B	C	D	E	
PS (mg)	22.06 b	21.70 b	16.66 c	31.45 a	30.34 a	2.26
VS (mm ³)	367.29 c	353.16 c	290.17 d	433.76 b	493.96 a	55.69
LS (mm)	11.55 bc	10.92 c	9.79 d	12.15 ab	12.42 a	0.85
AS (mm)	7.23 b	6.35 c	6.58 c	7.46 ab	7.91 a	0.55
GS (mm)	4.40 b	5.09 a	4.50 b	4.78 ab	5.03 a	0.43
DRS	1.07 b	1.06 b	1.37 a	1.37 a	1.22 ab	0.17
AS/LS	0.63 ab	0.59 b	0.67 a	0.61 ab	0.65 ab	0.08
GS/LS	0.38 b	0.47 a	0.46 a	0.39 b	0.41 ab	0.06
PN (%)	50 ab	68 ab	45 b	60 ab	83 a	34.98
PA (%)	5 a	5 a	5 a	5 a	0 a	13.81
SI (%)	45 ab	27 ab	50 a	35 ab	17 b	31.64
LP (mm)	9.59 a	7.45 ab	6.23 b	8.10 ab	8.38 ab	2.79
LR (mm)	12.80 b	13.45 b	12.50 b	13.98 b	19.48 a	2.57
LT (mm)	22.39 b	20.91 b	18.73 b	22.08 b	27.87 a	4.22
PSP (mg)	0.17 ab	0.16 ab	0.10 b	0.24 a	0.20 ab	0.10
PSR (mg)	0.17 b	0.20 b	0.15 b	0.30 ab	0.40 a	0.16
PST (mg)	0.34 bc	0.36 abc	0.26 c	0.54 ab	0.60 a	0.25

En hileras, letras diferentes indicaron diferencias significativas. Tukey=Diferencia Significativa Honesta. PS=Peso de semilla, VS=Volumen de semilla, LS=Longitud de semilla, AS=Ancho de Semilla, GS=Grosor de semilla, DRS=Diámetro relativo de semilla, AS/LS=Ancho de semilla/Longitud de semilla, GS/LS=Grosor de semilla/Longitud de semilla, PN=Plántulas normales, PA=Plántulas anormales, SI=Semillas inertes, LP=Longitud de plúmula, LR=Longitud de radícula, LT=Longitud total, PSP=Peso seco de plúmula, PSR=Peso seco de radícula, PST=Peso seco total.

En ambas cruzas (D y E), la heterosis fluctuó ampliamente, desde -55.71 (SI) a 92.16 % (PSP) (Cuadro 2). El 58 % de las variables mostró heterosis mayor en D que en E. En la crusa simple, las variables PSP, PST, PSR, PS y VS exhibieron la heterosis **más elevada; mientras que, en la trilineal, los valores más altos correspondieron a PSR, PN, LR y PST.** Las diferencias significativas de la heterosis entre D y E fueron negativas en PS, LS y SI, y positivas en GS/LS, PN, LR y LT.

Cuadro 2. Valores (%) de heterosis (H) y prueba de t de sus diferencias, para las variables físicas y fisiológicas evaluadas en las cruza simple (A) y trilineal (B) del híbrido experimental de maíz azul H10 E.

Variable	Genotipos		Diferencia (A-B)	t
	A	B		
	H	H		
PS	63.93	13.61	-50.32	**
VS	35.01	22.44	-12.57	ns
LS	17.31	4.79	-12.52	**
AS	15.37	7.83	-7.54	ns
GS	-0.36	9.71	10.07	ns
DRS	12.95	0.05	-12.9	ns
AS/LS	-2.06	3.80	5.86	ns
GS/LS	-15.07	5.63	20.7	*
PN	8.93	62.62	53.69	*
PA	25.00	-50.00	-75	ns
SI	0.00	-55.71	-55.71	*
LP	18.38	-4.21	-22.59	ns
LR	8.08	45.51	37.43	**
LT	11.37	25.56	14.19	*
PSP	92.16	-0.03	-92.19	ns
PSR	84.79	78.85	-5.94	ns
PST	87.96	41.68	-46.28	ns

*=Significativo ($P \leq 0.05$), **=Altamente significativo ($P \leq 0.01$), ns=No significativo. PS=Peso de semilla, VS=Volumen de semilla, LS=Longitud de semilla, AS=Ancho de Semilla, GS=Grosor de semilla, DRS=Diámetro relativo de semilla, PN=Plántulas normales, PA=Plántulas anormales, SI=Semillas inertes, LP=Longitud de plúmula, LR=Longitud de radícula, LT=Longitud total, PSP=Peso seco de plúmula, PSR=Peso seco de radícula, PST=Peso seco total, AS/LS=Ancho de semilla/Longitud de semilla, GS/LS=Grosor de semilla/Longitud de semilla.

La heterosis mayor de la cruza simple se debió a que la recombinación genética ocurrió entre dos líneas (homocigóticas) y en la trilineal participaron una cruza (heterocigótica) y una línea (Sanghera *et al.*, 2011).

En D, las variables PSP, PST, PSR, PS y VS asumieron la heterosis más alta; mientras que, en E, fueron PSR, PN, LR y PST; *i. e.*, en D se privilegiaron caracteres físicos y fisiológicos y sólo estos últimos en E; además, sus valores superaron ampliamente el 20 %, valor mínimo reportado para obtener ganancias genéticas en la hibridación (Díaz-Chuquizuta *et al.*, 2023).

Cada cruza hizo aportaciones diferentes a las características de semilla del HAZUL 10E; en D se incrementaron las dimensiones físicas y la materia seca de plántula; mientras que en E se favorecieron la formación de plántulas normales, la elongación

de radícula y la biomasa. Este argumento se constató también por las diferencias de heterosis (Cuadro 2) entre las cruzas, puesto que disminuyó ($P \leq 0.05$) en PS, LS y SI, y se incrementó ($P \leq 0.05$) en GS/LS, PN, LR y LT. Esto indicó que la secuencia de hibridación incidió primero sobre las dimensiones y después sobre la calidad fisiológica de la semilla. Es factible que los genotipos B y C compartieran secuencias génicas para germinación y desarrollo de plántula y por ello hubo heterosis marginal en estos eventos. Sin embargo, la línea A incidió notoria y favorablemente sobre ellos, lo que se puede atribuir a que esta línea se derivó de una colecta realizada en una región agroclimática distinta (Oaxaca, México) a la del resto de los genotipos del estudio (altiplano central de México), de manera que su bagaje genético pudo ser diferente y recombinó favorablemente (De León-Castillo *et al.*, 2006) y con heterosis alta en los atributos esenciales para la calidad fisiológica de la semilla (PN, LR, PSR y PST). Esta estrategia de emplear dos fuentes de germoplasma para desarrollar híbridos trilineales de maíz se ha sugerido para explotar la heterosis para la producción de semilla en maíz (Reif *et al.*, 2005).

4 CONCLUSIONES

La expresión de la heterosis fue mayor en la crusa simple que en la trilineal. En la crusa simple, la heterosis incrementó las dimensiones de semilla y la biomasa acumulada en las plántulas; mientras que en la crusa trilineal, incidió sobre la forma de semilla y las plántulas normales producidas.

REFERENCIAS

- Arellano-Vázquez, J.L.; Herrera-Zamora, A.; Gutiérrez-Hernández, G.F.; Ceja-Torres, L.F.; Flores-Gómez, E. 2021. Color, contenido de antocianinas y dimensiones de semilla en líneas endogámicas de maíz azul y sus cruzas. IDESIA (Chile) 39. 75-82.
- Arellano-Vázquez, J.L.; Rojas-Martínez, I. 2015. Mayor rendimiento con los nuevos híbridos de maíz azul H-Azul-10, H-Azul-12 y la Variedad Sintética VS-Azul-07 en siembras de temporal del Altiplano Central de México. Desplegable para productores No. 69. Campo Experimental Valle de México CIRCE-INIFAP. México.
- Arellano-Vázquez, J.L.; Rojas-Martínez, I.; Gutiérrez-Hernández, G.F. 2013. Híbridos y variedades sintéticas de maíz azul para el Altiplano Central de México: Potencial agronómico y estabilidad del rendimiento. Rev Mex Cienc Agric 4. 999-1011.
- Arellano-Vázquez, J.L.; Rojas-Martínez, I.; Gutiérrez-Hernández, G.F. 2014. Variedades de maíz azul Chalqueño seleccionadas por múltiples caracteres y estabilidad del rendimiento. Rev Mex Cienc Agric 5. 1469-1480. DOI: 10.29312/remexca.v5i8.828.
- Arellano-Vázquez, J.L.; Vázquez-Ramos, J.M.; García-Ramírez, E.; Gómez-y-Gómez, Y.M.; Gutiérrez-Hernández, G.F. 2017. Monitoreo de la calidad proteica de maíz o2 (*Zea mays* L.) en líneas endogámicas y su progenie F_1 y F_2 . Agrociencia 51 (4). 425-436.

De León-Castillo, H.; De la Rosa-Loera, A.; Rincón-Sánchez, F.; Martínez-Sambrano, G. 2006. Efectos genéticos, heterosis y diversidad genética entre híbridos comerciales de maíz adaptados al Bajío mexicano. *Rev Fitotec Mex* 29. 247-254.

Díaz-Chuquizuta, P.; Hidalgo-Meléndez, E.; Mendoza-Paredes, M.; Cieza-Ruiz, I.; Jara-Calvo, T.W.; Valdés-Rodríguez, O.A. 2023. Nuevo híbrido trilineal de maíz amarillo duro para el trópico peruano. *Agromeso* 34. 51177. DOI:10.15517/am.v34i1.51177

FAOSTAT (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Available online: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL> (accessed on 3 August 2022).

Guerrero-Guerrero, C.; Gallegos-Robles, M.A.; Luna-Ortega, J.G.; Orona-Castillo, I.; Vázquez-Vázquez, C.; García-Carrillo, M.; Moreno-Resendez, A.; González-Torres A. 2014. Combining ability and heterosis in corn breeding lines to forage and grain. *AJPS* 5. 845-856. DOI: 10.4236/ajps.2014.56098.

ISTA (International Seed Testing Association). International Rules for Seed Testing. Rules. Available online: http://www.seedtest.org/en/international-rules_content---1--1083.html (accessed on 19 October 2022).

Lee, E.A.; Tollenaar, M. 2007. Physiological basis of successful breeding strategies for maize grain yield. *Crop Sci* 47. S202-S215.

MacRobert, J.F.; Sentimela, P.S.; Gethi, J.; Worku, M. 2014. Manual de producción de semilla de maíz híbrido. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. CIMMYT, México, D. F., 37 p. Available online: <https://repository.cimmyt.org/bitstream/handle/10883/16849/57179.pdf> (accessed on 9 December 2022).

Nepir, G.; Wegary, D.; Zeleke, H. 2015. Heterosis and combining ability of highland quality protein maize inbred lines. *Maydica* 60. 1-12.

Reif, J.C.; Hallauer, A.R.; Melchinger, A.E. 2005. Heterosis and heterotic patterns in maize. *Maydica* 50. 215-223.

Sanghera, G.S.; Wani, S.H.; Hussain, W.; Shafi, W.; Haribhushan, A.; Singh, N.B. 2011. The magic of heterosis: New tools and complexities. *Nat Sci* 9. 42-53.

SAS (Statistical Analysis System). SAS/STAT Ver. 9. SAS Inst. Inc. 2002, Cary NC, USA.

Shull, G.H. 1909. A pure line method of corn breeding. *Am Breeders Assoc Rep* 5. 51-59.

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). Anuario estadístico de la producción agrícola. Servicio de información agroalimentaria y pesquera, agricultura. Ciudad de México, México. Available online: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola> (accessed on 3 August 2022).

Wuhaib, K.M.; Hadi, B.H.; Hassan, W.A. 2017. Estimation of genetic variation components, average degree of dominance, and heritability for several traits of maize in four crosses. *IOSR-JAVS* 10. 53-57.

CAPÍTULO 2

POTENCIAL GENOTÉCNICO DE HÍBRIDOS Y VARIEDADES SINTÉTICAS DE MAÍZ AZUL CON ADAPTACIÓN A VALLES ALTOS CENTRALES DE MÉXICO

Data de submissão: 06/07/2024

Data de aceite: 15/07/2024

José Luis Arellano-Vázquez

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Campo Experimental Valle de México
C. P. 56250. Coatlinchán
Estado de México, México
<https://orcid.org/0000-0002-2231-2940>

Germán Fernando Gutiérrez-Hernández

Instituto Politécnico Nacional
Unidad Profesional
Interdisciplinaria de Biotecnología
Av. Acueducto s/n
La Laguna Ticomán
C. P. 07340
Ciudad de México, México
<https://orcid.org/0000-0003-3312-3747>

Luis Fernando Ceja-Torres

Instituto Politécnico Nacional
Centro Interdisciplinario de
Investigación para el Desarrollo
Integral Regional Unidad Michoacán
Justo Sierra 28. C. P. 59510
Jiquilpan, Michoacán, México
<https://orcid.org/0000-0002-8397-0701>

Martín Filiberto García Mendoza

Instituto Politécnico Nacional
Unidad Profesional
Interdisciplinaria de Biotecnología
Av. Acueducto s/n
La Laguna Ticomán
C. P. 07340
Ciudad de México, México

Elpidio García Ramírez

Universidad Nacional
Autónoma de México
Facultad de Química
Av. Universidad y Copilco
Ciudad de México C.P. 04510
México

Estela Flores-Gómez

Instituto Politécnico Nacional
Unidad Profesional
Interdisciplinaria de Biotecnología
Av. Acueducto s/n
La Laguna Ticomán. C. P. 07340
Ciudad de México, México
<https://orcid.org/0000-0002-4634-455X>

Patricia Vázquez-Lozano

Instituto Politécnico Nacional
Unidad Profesional
Interdisciplinaria de Biotecnología
Av. Acueducto s/n
La Laguna Ticomán. C. P. 07340
Ciudad de México, México
<https://orcid.org/0000-0002-5945-6307>

RESUMEN: En el Campo Experimental Valle de México del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, se ha efectuado mejoramiento genético del maíz azul para desarrollar genotipos mejorados con características superiores, en términos de rendimiento y precocidad, entre otros propósitos. Dado que es necesario conocer el potencial de estos materiales, el objetivo del presente trabajo fue reseñar la evaluación de híbridos y variedades sintéticas de maíz azul desarrollados en el CEVAMEX-INIFAP, que se efectuó en cuatro localidades de Tlaxcala, México. Se estudiaron 14 híbridos trilineales, diez variedades sintéticas de maíz azul y un maíz criollo también de grano azul, colectado en Tlaxcala, México. Las variables medidas fueron: días a floración femenina, altura de planta, altura de mazorca, mazorcas por planta, acame, rendimiento de grano, densidad de población y plantas por parcela. Los datos se sometieron a análisis de varianza y comparación de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$). Se detectó que todas las variables fueron afectadas significativamente por los ambientes (localidades) de evaluación. Híbridos y variedades sintéticas también mostraron diferencias estadísticas entre localidades para floración femenina, grado de acame, mazorcas por planta y rendimiento de grano. Este último resultó influenciado significativamente por los ambientes de evaluación. Los genotipos evaluados superaron ampliamente al criollo regional utilizado como testigo, inclusive a densidades de población elevadas. Se concluyó que los materiales genéticos mejorados (híbridos y variedades sintéticas), fueron sobresalientes en rendimiento y caracteres de planta; por tanto, denotaron un potencial agronómico elevado y constituyen una alternativa para incrementar la producción de maíz azul en los Valles Altos Centrales de México.

PALABRAS CLAVE: *Zea mays* L.. Fitomejoramiento. Hibridación. Maíz pigmentado. Maíz sintético.

GENOTECHNIQUE POTENTIAL OF HYBRIDS AND SYNTHETIC VARIETIES OF BLUE CORN WITH ADAPTATION TO THE HIGH CENTRAL VALLEYS OF MEXICO

ABSTRACT: In the Experimental Field of the Valley of Mexico of the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Research (CEVAMEX-INIFAP), genetic improvement of blue corn has been carried out to develop improved genotypes with superior characteristics, in terms of yield and precocity, among other purposes. Since it is necessary to know the potential of these materials, the objective of this work was to review the evaluation of hybrids and synthetic varieties of blue corn developed at CEVAMEX-INIFAP, which was carried out in four locations in Tlaxcala, Mexico. Fourteen trilinear hybrids, ten synthetic varieties of blue corn, and one creole corn also with blue grain, collected in Tlaxcala, Mexico, were studied. The variables measured were days to female flowering, plant height, ear height, ears per plant, lodging, grain yield, population density, and plants per plot. The data were subjected to variance analysis and means comparison (Tukey, $\alpha = 0.05$). It was found that all variables were significantly affected by the evaluation environments (localities). Hybrids and synthetic varieties also showed statistical differences between localities for female flowering, degree of lodging, ears per plant, and grain yield. The evaluation environments significantly influenced the latter. The evaluated genotypes were widely superior to the regional creole used as a control, even at high population densities. It was concluded that the improved genetic materials (hybrids

and synthetic varieties) were outstanding in yield and plant traits; therefore, they showed high agronomic potential and constitute an alternative to increasing the production of blue corn in the Central High Valleys of Mexico.

KEYWORDS: *Zea mays* L.. Plant breeding. Hybridization. Pigmented corn. Synthetic corn.

1 INTRODUCCIÓN

Entre la variabilidad extensa del maíz (Kato *et al.*, 2009) se encuentra el azul, denominado así por el color que le confieren las antocianinas (Salinas *et al.*, 2013), pigmentos vegetales que se sintetizan el grano (Yang *et al.*, 2009) y se ubican en las vacuolas de pericarpio, aleurona, endospermo o embrión (Betrán *et al.*, 2001; Hernández-Uribe *et al.*, 2007; Salinas *et al.*, 2013). Las antocianinas son metabolitos secundarios hidrosolubles que se derivan de los flavonoides y son de color azul, púrpura o rojo (Salinas *et al.*, 2013).

El maíz azul es muy apreciado por los consumidores en amplia variedad de platillos de la cocina tradicional mexicana, tales como tortillas, tlacoyos y atoles, entre otros. A este alto grado de aceptación culinaria, actualmente se añade que se ha incrementado el interés industrial por este producto dadas las propiedades nutraceuticas y medicinales de las antocianinas. Además de su papel funcional como colorantes, las antocianinas son agentes nutraceuticos útiles para la salud (reducción de problemas cardiacos, cancerígenos, tumorales, inflamatorios o de diabetes) (Aguilera *et al.*, 2011), así como para la nutrición y la obtención de productos dermatológicos y cosméticos como cremas anti envejecimiento, desmaquillantes o labiales. Por otra parte, las antocianinas del maíz se utilizan en la elaboración de colorantes de vinos, mermeladas, jugos de fruta y textiles (Boo *et al.*, 2012). En consecuencia, existe un déficit de más de 120 mil toneladas de este producto en la región de los Valles Altos Centrales de México (Arellano *et al.*, 2014). Esta región geográfica presenta altitudes de 2200 a 2600 msnm y abarca los estados de México, Hidalgo, Puebla y Tlaxcala.

Mediante el mejoramiento genético es factible incrementar los rendimientos unitarios de maíz azul y esto contribuiría a satisfacer la mencionada demanda creciente de este producto agrícola. Entre las estrategias posibles para esto se tienen la hibridación y la formación de variedades sintéticas. Con el uso de híbridos el rendimiento se puede elevar entre 50 y 60 % (Duvick, 2005; Lee y Tollenaar, 2007), debido al aprovechamiento de la heterosis (Gudeta *et al.*, 2015) y a través de las variedades sintéticas los incrementos son menores, pero tienen la ventaja de ser de polinización libre, no requieren de semilla certificada cada ciclo de siembra y se van adaptando a la zona donde se cultivan.

Una variedad sintética es de polinización abierta (libre), se puede formar a través de la recombinación de un conjunto de líneas (Bernardo, 2002) o con las generaciones avanzadas de un híbrido aplicando selección masal (Jugenheimer, 1981). Las generaciones avanzadas de los híbridos de maíz que se utilizan en las regiones de temporal de los Valles Altos, son equivalentes a variedades sintéticas y se cultivan ampliamente debido al éxito en rendimiento que tuvo el productor con la semilla original del híbrido y a que no se requiere comprar semilla anualmente. Las variedades sintéticas son considerablemente más variables genotípicamente que los híbridos de cruza simple o doble, esto les permite amortiguar condiciones de crecimiento y producción adversas, por eso pueden ser más confiables que los híbridos en áreas de precipitación pluvial escasa, con presencia de heladas tempranas o tardías y suelos de fertilidad escasa (Jugenheimer, 1981).

Arellano *et al.* (2013) establecieron que existe buen potencial de rendimiento en las variedades criollas regionales; sin embargo, estos maíces expresan inconvenientes como textura de grano harinosa y alto nivel de acame de planta en las etapas de floración y llenado de grano. Esto significa que es posible, con base en este germoplasma criollo, desarrollar híbridos y variedades sintéticas de maíz azul resistentes al acame, con mejor proporción de mazorcas por planta y textura de grano semicristalina. Además, se requiere que los materiales genéticos nuevos expresen rendimientos mayores, toleren o escapen por precocidad a las heladas tan frecuentes en los Valles Altos y soporten siembras mecanizadas y con densidades altas de plantas por hectárea.

Con base en los argumentos anteriores, el objetivo del presente trabajo fue reseñar la evaluación de híbridos y variedades sintéticas de maíz azul desarrollados en el CEVAMEX-INIFAP, que se efectuó en cuatro localidades de Tlaxcala, México.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL GENÉTICO

Se evaluaron 14 híbridos trilineales y 10 variedades sintéticas de maíz azul con adaptabilidad a altitudes de 2300 a 2700 m generados por el Programa de Mejoramiento Genético de Maíz Azul del Campo Experimental Valle de México del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CEVAMEX, INIFAP).

Se empleó como testigo un maíz criollo de grano azul, colectado en Tlaxcala, México. Ambos tipos de poblaciones se constituyeron con líneas S_5 , derivadas de: i) maíz azul de la raza Bolita, de porte bajo de planta, resistencia al acame y grano azul con buena dureza; ii) maíz azul de la raza Chalqueño con buen rendimiento de grano en Valles Altos,

coloración azul intensa y grano grande; iii) maíz blanco de híbridos comerciales de Valles Altos del INIFAP, como fuente de resistencia al acame, porte bajo y grano semicristalino.

Las localidades de evaluación fueron Benito Juárez, Huamantla, Tlaxcalpan y Calpulalpan, con altitudes de 2450 a 2600 msnm, todas ellas en el estado de Tlaxcala, México.

2.2 VARIABLES EVALUADAS

Los datos registrados fueron: días a floración femenina (FF, d) considerados como el número de días transcurridos de la siembra a la emergencia de los estigmas, altura de planta (AP, cm), medida desde la superficie del suelo hasta la base de la espiga, altura de mazorca (AM, cm) desde la superficie del suelo hasta la base de inserción de la mazorca principal, número de mazorcas por planta (MPP) resultante de dividir el número de mazorcas cosechadas por parcela entre el número de plantas por parcela al momento de la cosecha, calificación visual de acame (ACA), escala de calificación de 1 a 5, donde 1 es plantas sin acame y 5 acame total, rendimiento de grano (REND, t ha⁻¹, calculado al 14 % de humedad del grano), densidad de población a la cosecha (DP, miles de plantas por hectárea) número de plantas por parcela a la cosecha multiplicado por el factor de conversión de la superficie de la parcela respecto a una hectárea.

2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con los datos registrados se hicieron análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Estos análisis se realizaron con el programa estadístico SAS (SAS, 1999).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectaron diferencias estadísticas ($\alpha \leq 0.01$) para todas las variables entre localidades (Loc), para Var (que incluye híbridos y sintéticos) hubo significancia en FF, ACA, MPP y REND y, en la interacción Var x Loc, solo el rendimiento fue significativo (Cuadro 1), esto evidenció que la variación ambiental entre localidades afectó sensiblemente la expresión de todas las características analizadas; mientras que, la diferencia entre genotipos indicó la existencia de variabilidad genética para los caracteres medidos y la significancia de la interacción Loc x Var se causó por el efecto de las mencionadas fluctuaciones ambientales sobre el rendimiento.

Cuadro 1. Cuadrados medios y significancia estadística para los caracteres evaluados en híbridos y variedades sintéticas de maíz azul en cuatro localidades de Tlaxcala, México.

F de V	g l	FF	AP	ACA	MPP	REND	DP
Loc	3	355.4**	9813.5**	22172.9**	0.2**	112631095**	805.9**
Rep (Loc)	8	41.6	264.4	327.0	0.3	675424.1	69.7
Var	24	15.2**	359.4	790.4**	0.1**	8240574.2**	36.8
Loc x Var	72	10.1	232.7	325.0	0.2	3469440**	77.0**
Error	192	8.1	273.1	225.3	0.01	295491	48.2
Total	299						
C V (%)		2.8	7.0	27.0	12.1	8.9	10.6

F de V=Fuente de variación; Loc=Localidades; Rep=Repeticiones; Var=Variedades; g l = grados de libertad; FF=Floración femenina (d); AP=Altura de planta (cm); ACA=Calificación de acame de planta (1 a 5); MPP=Número de mazorcas por planta; REND=Rendimiento de grano (ton ha⁻¹); DP=Densidad de Población (miles plantas ha⁻¹); **=Significativo ($\alpha=0.05$); C V=Coeficiente de variación. (Adaptado de Arellano *et al.*, 2013).

Todas las variedades sintéticas superaron estadísticamente el rendimiento del maíz criollo utilizado como testigo, a excepción de la VSA-907, con cantidades de 1.2 a 3.2 t ha⁻¹ (Cuadro 2). Respecto a la densidad de población de plantas registradas a la cosecha, se observaron de 62 291 a 67 395 plantas por hectárea, que representan densidades elevadas, propias para siembra de híbridos en áreas de buena productividad, esto indicó que los híbridos y variedades sintéticas bajo estudio respondieron favorablemente a la competencia entre plantas.

Cuadro 2. Promedios de rendimiento de grano, días a floración femenina y caracteres de planta de los híbridos y variedades sintéticas de maíz azul evaluados en cuatro localidades de Tlaxcala, México.

Variedad	REND (t ha ⁻¹)	FF (días)	AP (cm)	ACA (1-5)	MPP	DP (plts ha ⁻¹)
HA-911	10.2 a	99 a	237 a	1.2 c	1.1 b	67185 a
HA-901	10.1 a	97 b	236 a	1.6 a	1.3 a	67395 a
HA-914	9.9 a	98 a	238 a	1.6 b	1.2 a	65729 a
VSA-902	9.7 a	100 a	235 a	1.4 c	1.3 a	66014 a
HA-907	9.6 a	99 a	231 a	1.5 b	1.0 c	67500 a
HA-912	9.6 a	100 a	227 a	1.5 a	1.0 c	65000 a
HA-908	9.5 a	98 a	238 a	1.6 a	1.2 a	62708 a
VSA-904	9.5 a	100 a	226 a	1.6 b	1.2 a	65000 a
HA-913	9.5 a	99 a	240 a	1.6 a	1.2 a	62500 a
HA-902	9.4 a	99 a	243 a	1.6 b	1.0 c	66354 a
HA-910	9.4 a	100 a	242 a	1.4 a	1.1 b	66562 a
HA-906	9.3 b	99 a	231 a	1.7 a	1.1 b	66770 a
HA-905	9.2 c	100 a	233 a	1.5 a	1.0 c	64166 a
HA-903	8.8 d	98 a	230 a	1.6 a	1.0 c	63020 a
VSA-908	8.6 e	101 a	235 a	1.7 a	1.1 b	67500 a

VSA-903	8.6 e	101 a	240 a	1.6 b	1.2 a	67083 a
VS-910	8.4 f	101 a	230 a	1.5 b	1.2 a	63750 a
HA-904	8.2 g	98 a	243 a	1.4 a	1.0 c	63654 a
HA-909	8.2 g	100 a	226 a	1.6 a	1.0 c	65312 a
VSA-906	8.2 g	99 a	242 a	1.3 c	1.2 a	65312 a
VSA-901	8.0 g	100 a	227 a	1.4 c	1.2 a	64062 a
VSA-905	7.8 h	101 a	228 a	1.7 b	1.2 a	63020 a
VSA-909	7.7 i	101 a	231 a	1.6 b	1.2 a	65104 a
VSA-907	7.2 j	99 a	236 a	1.4 c	1.1 b	62291 a
Criollo	6.5 j	100 a	232 a	2.1 a	0.9 d	67601 a
Tukey ($\alpha=0.05$)	0.83	4.3	25.0	0.6	0.21	10530

En columnas, medias con la misma letra son estadísticamente similares (Tukey, 0.05). REND=Rendimiento de grano; FF=Días a floración femenina; AP=Altura de planta; ACA= Calificación de acame de plantas; MPP=Número de mazorcas por planta; DP=Densidad de Población a la cosecha, plantas ha⁻¹. (Adaptado de Arellano *et al.*, 2013).

4 CONCLUSIONES

Los híbridos y variedades sintéticas sobresalientes en rendimiento y caracteres de planta mostraron buen potencial agronómico en las localidades de estudio; por tanto, son una alternativa para elevar la producción de maíz azul en los Valles Altos. Las variedades sintéticas sobresalientes presentaron un rendimiento competitivo con respecto a los mejores híbridos.

REFERENCIAS

Aguilera Ortiz, M.; Reza Vargas, M.D.; Chew Madinaveitia, G.; Meza Velázquez, J.A. 2011. Propiedades funcionales de las antocianinas. Revista Biotecnia, XIII (2): 16-22. <https://biblat.unam.mx/hevila/Biotecnia/2011/vol13/no2/2.pdf>

Arellano Vázquez, J.L.; Rojas Martínez, I.; Gutiérrez Hernández, G.F. 2013. Híbridos y variedades sintéticas de maíz azul para el Altiplano Central de México: potencial agronómico y estabilidad del rendimiento. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 4 (7): 999-101.

Arellano Vázquez, J.L.; Rojas Martínez, I.; Gutiérrez Hernández, G.F. 2014. Variedades de maíz azul Chalqueño seleccionadas por múltiples caracteres y estabilidad del rendimiento. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 5 (18): 1469-1480.

Bernardo, R. 2020. Breeding for quantitative traits in plants. 3rd ed. Stemma Press, Woodbury, MN. 422 p. ISBN 978-0-9720724-3-4

Betrán, F.J.; Bockholt, A.J.; Rooney, L.W. 2001. Blue corn. In: A.R. Hallauer (ed.). Speciality corns. Iowa State University. Ames, Iowa, USA. pp. 293-337.

Boo, H.O.; Hwang, S.J.; Bae, C.S.; Park, S.H.; Heo, B.G.; Gorinstein, S. 2012. Extraction and characterization of some natural plant pigments. Industrial Crops and Products 40: 129-135.

- Duvick, D.N. 2005. The contribution of breeding to yield advances in maize (*Zea mays* L.) Adv Agron 86: 83-145.
- Gudeta, N.G.; Dagne, W.G.; Habtamu, Z.U. 2015. Heterosis and combining ability of highland quality protein maize inbred lines. Maydica 60: 1-12.
- Hernández-Uribe, J.P.; Agama-Acevedo, E.; Islas-Hernández, J.J.; Tovar, J.; Bello-Pérez, L.A. 2007. Chemical composition and *in vitro* starch digestibility of pigmented corn tortilla. Journal Science of Food Agriculture, 87: 2482-2487.
- Jugenheimer, R.W. 1981. Maíz: Variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semilla. 1981. Traducción al español Piña, G.R. Limusa. México, D. F., 481 p.
- Kato Y., T.Á.; Mapes S., C.; Mera O., L.M.; Serratos H., J.A.; Bye B., R.A. 2009. Diversificación y distribución reciente del maíz en México. Origen y diversificación del maíz. México, D.F. 116 p.
- Lee, E.A.; Tollenaar, M. 2007. Physiological basis of successful breeding strategies for maize grain yield. Crop Sci 47: 202-215.
- Salinas M., Y.; García S., C.; Coutiño E., B.; Vidal M., V.A. 2013. Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul/ morado de poblaciones mexicanas de maíz. Revista Fitotecnia Mexicana 36: 285-294.
- SAS (Statistical Analysis System). SAS Institute. 1999. SAS user's guide. Statistics. Version 8. SAS Inst. Cary, NC. USA.
- Yang, Z.; Chen, Z.; Yuan, S.; Zhai, W.; Piao, X.; Piao, X. 2009. Extraction and identification of anthocyanin from purple corn (*Zea mays* L.). International Journal of Food Science and Technology, 44: 2485-2492.

CAPÍTULO 3

COMPORTAMIENTO DE LA MANIPULACIÓN DE PLANTAS INJERTADAS DE LIMÓN PERSA DURANTE LA ETAPA DE PREPRODUCCIÓN DE PLANTA

Data de submissão: 28/06/2024

Data de aceite: 11/07/2024

Pablo Ulises Hernández Lara

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)
Campo Experimental Huimanguillo
Huimanguillo, Tabasco, México
<https://orcid.org/0009-0000-6976-7574>

Diana Rubi Ramos López

Universidad Popular de la Chontalpa
Cárdenas, Tabasco, México

Felipe Mirafuentes Hernández

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)
Campo Experimental Huimanguillo
Huimanguillo, Tabasco, México

RESUMEN: Este estudio destaca la importancia de técnicas adecuadas de manejo en la propagación de limón Persa por injerto para mejorar la calidad y rendimiento de las plantas. La región Golfo Centro de México cuenta con unidades certificadas que producen seis millones de plantas al año, aunque la demanda excede la oferta, involucrando a viveros no certificados con riesgos para la sanidad. La formación de “arbolitos”, plantas con múltiples tallos débiles

y competitivos debido a técnicas de manejo que favorecen la emergencia de varios brotes por yema injertada es un problema común en la preproducción de plantas de limón Persa. La investigación evalúa diferentes técnicas de manipulación de plantas y tipos de injerto, encontrando diferencias significativas en la velocidad de brotación y el número de brotes por yema. Las técnicas que preservan solo una yema apical por portainjerto tienden a favorecer un brote único y robusto, lo cual es óptimo para el establecimiento exitoso en el campo. En conclusión, las técnicas Corte a Medio Camino y Doblado (CMCyD) y Solo Doblado (SDOB) permiten la emergencia de un brote por yema injertada, lo que es favorable para la producción de plantas con características agronómicas ideales.

PALABRAS-CLAVE: Producción de plantas. Limón Persa. Técnicas de manejo. Injertos.

1 INTRODUCCIÓN

Una de las formas más comunes para propagar plantas de limón Persa es por vía injerto, para ello se utilizan diferentes portainjertos, los cuales influyen en la entrada a producción, tolerancia a enfermedades, tolerancia a limitantes del suelo y clima, entre otros. Los portainjertos se utilizan para injertar yemas provenientes de árboles con copas sanas, sostienen al cultivar de interés

y proveen el anclaje. Diferentes estudios demuestran que son varios los factores que intervienen en la calidad del injerto, entre estos, la técnica, la compatibilidad, la sanidad, el vigor, la edad de los portainjertos y el manejo post-injerto (Kawaguchi *et al.*, 2008). El insumo principal de la actividad citrícola es la planta, cuya producción y comercialización tiene su propia problemática (Curti-Díaz *et al.*, 2023). Pues con base a la NOM-079-FITO-2002, ésta debe estar libre de los principales patógenos que existen, como son virus tristeza, psorosis, caquexia, exocortis y huanglongbing (DOF, 2002). Para ello, en la región Golfo Centro, en atención a la NOM citada, existen 42 Unidades de Producción Certificadas, de las cuales 23 corresponden a Viveros Propagadores de Planta (VPP) certificados (SENASICA, 2023). Se estima que en la región se producen más de seis millones de plantas certificadas anualmente, las cuales no cubren la demanda existente, lo que da lugar a la participación de viveros no certificados con una cantidad similar y que ofrecen planta de origen y sanidad incierta, lo que conlleva el riesgo de diseminar las enfermedades mencionadas, y si fuera el caso, la productividad de las huertas puede ser menor (Curti-Díaz *et al.*, 2023). Aunado a la problemática anterior, otro inconveniente en la etapa de pre-producción de planta, reflejado en ambos sistemas, es la producción de plantas tipo “arbolito”, las cuales, son plantas con varios tallos que se originan en un mismo punto a partir de la yema injertada y que genera tallos delgados, poco vigorosos y con riesgo de rompimiento, debido a la competencia por luz, agua y nutrientes que existe. El desarrollo de plantas con las características mencionadas, se debe en gran medida a que, por costumbre y comodidad, el personal injertador decapita la copa del portainjerto para facilitar el proceso de injertación, aumentando el número de plantas injertadas por jornada de trabajo. La desventaja de decapitar la copa, da paso a la emergencia de varios brotes por yema injertada. Existen técnicas de manipulación de plantas en la propagación de limón Persa vía injerto que influyen en la emergencia de uno o más brotes por yema injertada, así como en la velocidad de brotación y porcentaje de prendimiento, pero que han sido poco probadas e investigadas, por lo tanto, no son aceptadas por personal injertador y personal responsable de VPP certificados y no certificados. Sin embargo, con estas técnicas de manipulación de las plantas se busca que emerja un brote por yema injertada. Por lo anterior, la presente investigación tiene como objetivo evaluar el comportamiento de plantas injertadas de limón Persa y su combinación con diferentes técnicas de manipulación de las mismas.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se utilizó semilla del portainjerto volkameriana, proveniente de la Unidad de Producción de Material Propagativo de Cítricos (UPMPC) de la empresa Promotora Citrícola del Golfo S.A de C.V. La siembra de la semilla se realizó en charolas de 50 cavidades con peat most como sustrato. Para el trasplante se utilizaron bolsas de polietileno calibre 300 de 20 cm x 35 cm y se utilizó tierra de vega de río como sustrato. Las varetas se seleccionaron en campo a partir de árboles con características sobresalientes de sanidad, calidad y producción de fruta. *Establecimiento del experimento.* Se desarrolló en un invernadero bajo estructura protegida con malla antiáfido, en las instalaciones del INIFAP-CEHUI, Tabasco (17° 51' 04.52" N y 93° 23' 46.96" O). Durante el desarrollo del portainjerto, las plantas se colocaron sobre estructuras de metal a una altura de 0.80 m buscando alejamiento del piso y fácil manejo para las labores agronómicas. *Tratamientos y diseño experimental.* El experimento se conformó por tres tipos de injerto (T, ⊥ y Enchape Lateral) en combinación con tres técnicas de manipulación de las plantas (Decapitado, Corte a Medio Camino y Doblado y Solo Doblado) (Cuadro 1); y se realizó un análisis de varianza con el software estadístico SAS versión 9.3. Las plantas se injertaron a los seis meses de edad. *Comportamiento de plantas injertadas.* Se contó el número de brotes a los 50 días después del injerto (DDI), se determinó la velocidad de brotación y el porcentaje de prendimiento con las ecuaciones 1 y 2, respectivamente. 1: Velocidad de brotación = número de plantas prendidas / número total de días x 100, 2: Porcentaje de prendimiento = número de plantas prendidas / número de plantas injertadas x 100.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos conformados por tres tipos de injerto y tres técnicas de manipulación de plantas de limón Persa en etapa de pre-producción de planta.

Tratamientos	Repeticiones	Tipos de injerto	Técnicas de manipulación de las plantas	Descripción
T1	15	T	Decapitado	T DEC
T2	15	T	Corte a Medio Camino y Doblado	T CMCyD
T3	15	T	Solo Doblado	T SDOB
T4	15	⊥	Decapitado	⊥ DEC
T5	15	⊥	Corte a Medio Camino y Doblado	⊥ CMCyD
T6	15	⊥	Solo Doblado	⊥ SDOB
T7	15	Enchape Lateral	Decapitado	E. L DEC
T8	15	Enchape Lateral	Corte a Medio Camino y Doblado	E. L CMCyD
T9	15	Enchape Lateral	Solo Doblado	E. L SDOB

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis estadístico mostró diferencias significativas en la velocidad de brotación y en el número de brotes por yema injertada (Cuadro 2). El tratamiento E. L DEC superó la mayoría de los tratamientos con 31.7 días en la velocidad de brotación, aunque estadísticamente fue igual a los tratamientos T DEC, ⊥ DEC y E. L CMCyD. De acuerdo con responsables de VPP, cuando se decapita la planta previa al proceso de injertación, la velocidad de brotación de la yema injertada se acelera, debido a la eliminación de la yema apical del portainjerto. Lo anterior se atribuye a que el portainjerto, al no tener hojas, la reserva de alimento es menor, por lo que el agua y nutrientes retornan a partir de la decapitación, teniendo una menor vía que recorrer. Caso contrario, con las técnicas CMCyD y SDOB, las plantas permanecen con las hojas en la copa, teniendo una mayor reserva de alimento a partir de la fotosíntesis que realizan. Con dichas técnicas se logra que emerja un brote debido a un mayor suministro de energía en la planta. También se observó que, al realizar cualquier tipo de injerto en combinación con las técnicas CMCyD y SDOB, las yemas tardan más tiempo en brotar, con la diferencia que emerge un brote por yema injertada, siendo esto último lo ideal. Los tratamientos ⊥ SDOB y E. L SDOB alcanzaron el mayor tiempo con 62.8 y 61.7 días en la velocidad de brotación, respectivamente. La planta, al producir un brote por yema injertada proporciona múltiples ventajas, ya que, al salir a campo con la madurez óptima y al realizar la poda de formación adecuada, los brotes emergerán en diferentes puntos, lo cual proveerá una estructura conveniente. Una planta al salir a campo con un brote maduro, no tendrá ningún problema en el manejo al momento de la implantación. Lo anterior coincide con Villegas Monter (2018), donde menciona que, en la producción de planta certificada injertada bajo la técnica de solo doblado, la planta desarrolla un brote maduro y esta al salir a campo garantiza éxito.

Cuadro 2. Respuesta de los tipos de injerto y las técnicas de manipulación de las plantas en el número de brotes por yema injertada a los 50 días después del injerto (DDI) y en la velocidad de brotación por yema injertada.

Tipos de injerto	Técnicas de manipulación de las plantas	Número de brotes por yema injertada a los 50 DDI	Número de días en la velocidad de brotación después del injerto
T	DEC	3 b	33.2 a
T	CMCyD	1 a	55.4 b
T	SDOB	1 a	59.7 b
⊥	DEC	4 b	33.1 a
⊥	CMCyD	1 a	48.5 b
⊥	SDOB	1 a	62.8 c

E. L	DEC	5.5 c	31.7 a
E. L	CMCyD	1.6 a	42.6 a
E. L	SDOB	1 a	61.7 c

* Medias con la misma letra dentro de las columnas, son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05\%$.

Por otro lado, lo que se obtiene con la técnica DEC es una sobrebrotación a partir de la yema injertada. Esto se observó en los tres tipos de injerto donde se decapitaron las plantas, siendo los tratamientos T DEC, \perp DEC y E. L DEC los que manifestaron dicha cualidad, con un promedio de 4.1 brotes por yema injertada. Cuando los brotes emergen a partir del mismo punto compiten entre ellos, lo cual provoca plantas débiles y poco vigorosas, haciéndolas susceptibles al momento de establecerse en terreno definitivo. Para efectos del porcentaje de prendimiento por yema injertada, se lograron prendimientos aceptables (Cuadro 3), para ello se cuantificó de acuerdo a la ecuación descrita y se analizaron sus medias. Se observó mayor prendimiento en los tratamientos E. L DEC y E. L CMCyD con un 100% de las yemas injertadas. Tomando en cuenta todos los tratamientos con sus repeticiones, se obtuvo un porcentaje de prendimiento general de 89.6% de las yemas injertadas. Según responsables técnicos de VPP, 2023 (comunicación personal), prendimientos por encima del 80% son aceptables de manera experimental.

Cuadro 3. Respuesta de los tipos de injerto y las técnicas de manipulación de las plantas en el porcentaje de prendimiento por yema injertada.

Tipos de injerto	Técnicas de manipulación de las plantas	Prendimiento por yema injertada (%)
T	DEC	86.6
T	CMCyD	93.3
T	SDOB	86.6
\perp	DEC	80
\perp	CMCyD	80
\perp	SDOB	86.6
E. L	DEC	100
E. L	CMCyD	100
E. L	SDOB	93.3

4 CONCLUSIONES

Con las técnicas CMCyD y SDOB se obtuvo como respuesta la emergencia de un brote por yema injertada aun cuando se realiza cualquier tipo de injerto. Ambas técnicas pueden utilizarse para propagar plantas con características agronómicas ideales para salir campo y ser implantadas en terreno definitivo con éxito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Curti-Díaz, S. A., P. U. Hernández-Lara, J. Rangel-Quintos, C. G. Rodríguez-Quibrera, S. Domínguez-Monge, M. Rodríguez-Cuevas y D. Sumano-López. 2023. Programa de investigación, validación y transferencia de tecnología de las cadenas agroalimentarias de naranja y limón Persa del CIR Golfo Centro del INIFAP (Manuscrito en proceso de publicación). Publicación Especial. Veracruz, México. 121 p. Versión digital.

DOF. 2002. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-079-FITO-2002. Requisitos fitosanitarios para la producción y movilización de material propagativo libre de virus tristeza y otros patógenos asociados a cítricos. 12 pp. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/nom-079-fito-2002> (consultado en marzo de 2023).

Kawaguchi, M., A. Taji, D. Backhouse and M. Oda. 2008. Anatomy and physiology of graft incompatibility in solanaceous plants. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 83: 581-588.

Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2023. Directorio de Unidades de Producción de Material Propagativo de Cítricos (UPMPC). DGSV. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/807363/DIRECTORIO_UPMPC_02-03-2023.pdf. (consultado en marzo de 2023).

Villegas M., A. 2018. Producción de material certificado de lima Persa (*Citrus latifolia*). Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA). (Archivo de video). Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=x0p2Oz-OND4&t=2698s>. (consultado en abril de 2023).

CAPÍTULO 4

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DO LÚPULO: EFEITO DO COMPRIMENTO DE ESTACAS E DOSES DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO NA PRODUÇÃO DE MUDAS

Data de submissão: 19/06/2024

Data de aceite: 04/07/2024

Dalva Paulus

Doutora em Agronomia
Docente Permanente do Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Dois Vizinhos, Estrada para Boa Esperança, km 04, 85660-000
Dois Vizinhos – Paraná, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/6250058667440979>
<https://orcid.org/0000-0002-8385-9173>

Mateus Dall’Agnol

Acadêmico do Curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Dois Vizinhos, Estrada para Boa Esperança, km 04, 85660-000
Dois Vizinhos – Paraná, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/2042374356003696>

Dislaine Becker

Mestre em Ciências Agrárias do Programa de Mestrado em Agroecossistemas Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Dois Vizinhos, Estrada para Boa Esperança, km 04, 85660-000
Dois Vizinhos – Paraná, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/8204128486204146>

RESUMO: A planta do lúpulo pertence à família Cannabaceae é de grande importância para as cervejarias. Para essa espécie a propagação vegetativa por estacas é muito utilizada devido à dificuldade em produzir sementes, e também pela vantagem dos descendentes serem iguais à planta-matriz. Objetivou-se avaliar a propagação vegetativa de lúpulo mediante diferentes tamanhos de estacas e concentrações de ácido indolbutírico (AIB) em hidroponia. O experimento foi conduzido em ambiente protegido na Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Dois Vizinhos, no período de setembro à novembro de 2019. O delineamento experimental foi em esquema fatorial, onde o fator 1: tamanho de estacas: 5, 7 e 9 cm e fator 2: doses de ácido indol butírico (AIB) 0, 500, 1500 mg L⁻¹, com três repetições. Cada unidade experimental com 10 estacas, totalizando 270 estacas. As estacas foram colocadas para enraizar em espuma fenólica em sistema hidropônico de fluxo laminar de nutrientes (NFT), com solução nutritiva Furlani (50%), durante 25 dias. As variáveis analisadas foram altura, número de folhas, comprimento da maior raiz, massas fresca e seca (parte aérea e raiz). Estacas com 9 cm de comprimento e a dose de 1500 mg L⁻¹ apresentaram maior crescimento em altura, número de folhas, comprimento da maior raiz. Para as variáveis massa fresca da parte aérea e da raiz as estacas de 5 e 7 cm obtiveram os melhores resultados na dose de 500 mg L⁻¹ de AIB. As estacas de 9 cm e na dose de 1500 mg

L⁻¹ de AIB resultaram em maior acúmulo de massas fresca e seca da parte aérea e raiz. Conclui-se que para propagação vegetativa de lúpulo estacas com 9 cm de comprimento e a dose de 1500 mg L⁻¹ de AIB apresentaram os melhores resultados de crescimento e acúmulo de biomassa. A utilização do ácido indolbútrico é uma maneira de tornar o enraizamento mais eficiente, possibilitando ao produtor de lúpulo benefícios em termos de maior qualidade de mudas de lúpulo.

PALAVRAS-CHAVE: *Humulus lupulus* L. Propagação vegetativa. Auxinas.

LENGTH OF CUTTINGS AND DOSES OF INDOLBUTYRIC ACID IN THE PRODUCTION OF HOP SEEDLINGS IN HYDROPONICS

ABSTRACT: The hop plant belongs to the Cannabaceae family and is of great importance for breweries. For this species, the vegetative propagation by cuttings is widely used due to the difficulty in producing seeds, and also due to the advantage of the descendants being equal to the parent plant. The objective of this study was to evaluate the vegetative propagation of hops using different cuttings sizes and concentrations of indolbutyric acid (IBA) in hydroponics. The experiment was conducted in a protected environment at the Federal University of Technology of Paraná - Campus Dois Vizinhos, from September to November 2019. The experimental design was in a factorial scheme, where factor 1: cuttings size: 5, 7 and 9 cm and factor 2: doses of indole butyric acid (IBA) 0, 500, and 1500 mg L⁻¹, with three replications. Each experimental unit 10 cuttings, cuttings totaling 270. The cuttings were placed to root in phenolic foam in a hydroponic system of laminar flow of nutrients (NFT), with Furlani nutrient solution (50%), for 25 days. The variables analyzed were height, number of leaves, length of the largest root, fresh and dry mass (aerial part and root). Cuttings 9 cm long and the dose of 1500 mg L⁻¹ showed greater growth in height, number of leaves, length of the largest root. For the variables fresh weight of the aerial part and the root, the cuttings of 5 and 7 cm obtained the best results in the dose of 500 mg L⁻¹ of IBA. The 9 cm cuttings and the 1500 mg L⁻¹ dose of IBA resulted in a greater accumulation of fresh and dry masses of the aerial part and root. It was concluded that for vegetative propagation of hops cuttings 9 cm long and the 1500 mg L⁻¹ dose of AIB showed the best results for growth and biomass accumulation. The use of indolbutyric acid is a way of making rooting more efficient, enabling the hop grower to benefit from higher quality hop seedlings.

KEYWORDS: *Humulus lupulus* L. Vegetative propagation. Auxin.

1 INTRODUÇÃO

O lúpulo (*Humulus lupulus* L) é uma espécie natural do Hemisfério Norte de origem europeia, com característica de ser trepadeira e perene, sendo utilizado para diversos fins, na indústria de cosméticos, como planta medicinal e na produção da cerveja (Marcos et al., 2011). É uma planta dioica que pertence à família Cannabaceae (Silva e Faria, 2008). O caule apresenta pilosidades e é oco, de cor verde ou violeta (Marcos et al., 2011). No caule se tem as estípulas, local onde saem às folhas, que são opostas. Os bordos das folhas são serrados e apresentam uma pubescência na parte inferior (Rodrigues et al., 2015).

O lúpulo apresenta glândulas de lupulina que armazenam resinas e óleos essenciais, com propriedades anti-inflamatórias, anti-bacterianas e antioxidantes (Farang e Wessjohann, 2012), o que o torna um ótimo conservante, pois evita a contaminação pela bactéria Gram positiva (Silva e Faria, 2008). Somente as flores femininas são utilizadas para a produção da cerveja, pois na resina se tem os alfa e beta ácidos que são responsáveis pelo amargor da cerveja (Canbas et al., 2001).

É uma planta que se reproduz tanto de maneira sexuada (sementes) quanto de maneira assexuada (estaca ou rizoma). Sendo a propagação vegetativa mais largamente usada a nível comercial, devido a não segregação dos caracteres da variedade (Rodrigues et al., 2015). De acordo com os autores a propagação assexuada faz com que a progênie tenha as mesmas características da planta mãe, além de ter uma redução do período juvenil e maior taxa de pegamento do que via semente, uma vez que se faz necessário à quebra da dormência, imersão, lavagem e refrigeração, o que caracteriza um processo demorado, trabalhoso e custoso.

A propagação assexuada através da estaquia se torna uma alternativa para obter plantas homogêneas e com características desejáveis (Lima et al., 2010). Fachinello et al. (2005) afirmam que na propagação vegetativa por estaquia, a rizogênese adventícia ocorre em segmentos destacados da planta matriz a partir da influência e equilíbrio de diferentes reguladores de crescimento que, sob condições favoráveis, originam outra planta.

De acordo com Hartmann et al., (2011) o ácido 3-indolbutírico (AIB) é uma auxina amplamente usada no estímulo ao enraizamento, o que se deve à sua menor mobilidade, fotosensibilidade e maior estabilidade química na planta. Segundo Fachinello et al., (2005) o AIB pode promover a formação de raízes em estacas, acelerar a iniciação radicular, aumentar número e qualidade de raízes produzidas e aumentar a uniformidade de enraizamento.

Uma técnica promissora para produção de mudas por propagação vegetativa é o cultivo hidropônico, utilizando como substrato a espuma fenólica, permite produção rápida de mudas sadias, livres de fitopatógenos, e o uso racional da água (Santos, 2015).

O cultivo do lúpulo no Brasil é uma atividade recente, pouca informação se tem a respeito dessa cultura. Nesse sentido, verifica-se a importância de pesquisas que gerem informações para os produtores, quanto à propagação do lúpulo. Dessa forma, objetivo do trabalho foi avaliar a propagação vegetativa do lúpulo mediante diferentes tamanhos de estacas e doses de ácido indolbutírico (AIB).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no período de setembro a novembro de 2019, em ambiente protegido modelo em arco, com cobertura plástica de polietileno de baixa densidade, situado na área experimental da Unidade de Ensino e Pesquisa em Olericultura da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – Campus Dois Vizinhos, localizada na região Sudoeste do Paraná (latitude de 25° 69' S, longitude de 53° 09' W e altitude média de 546 m) (Inmet, 2019). Segundo a classificação de Koppen o clima da região é classificado como Cfa-subtropical úmido, sem estação seca definida e temperatura média do mês mais quente de 22°C (Alvares et al., 2013).

A cultivar estudada foi a Cascade oriunda de plantas adultas com dois anos, cultivadas no setor de olericultura da UTFPR.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, em esquema fatorial, onde o fator 1: tamanho de estacas: 5, 7 e 9 cm e fator 2: doses de ácido indol butírico (AIB) 0, 500, 1500 mg L⁻¹, com três repetições. Cada repetição com 10 estacas, totalizando 270 estacas.

As estacas foram oriundas da porção basal da planta, cortadas logo acima da gema. Deixou-se uma folha em cada estaca. A base das estacas foi imersa (1cm) durante dez segundos (Coelho e Messias, 2000), em solução hidroalcoólica de AIB (5 ml por tratamento). As concentrações (mg L⁻¹) de: 0, 500 e 1500 que foram obtidas por meio da dissolução de ácido indol-3-butírico com 99% de pureza, produzido pela MERCK em solvente composto de 50% de água destilada e 50% de álcool etílico p.a. de 99,5% de pureza (Hartmann et al., 2011). O controle consistiu de água destilada.

As estacas foram colocadas para enraizar em espuma fenólica de dimensões (3 x 3 cm) e mantidas em perfis de polipropileno no sistema de fluxo laminar de nutrientes (NFT) com solução nutritiva Furlani (1998) a 50%. Cada perfil continha um tratamento com 27 estacas. Os intervalos de irrigação eram controlados com temporizador (timer), com intervalo de 15 minutos ligado e 15 minutos desligado durante o dia, e a noite 30 minutos ligado e 30 minutos desligado.

O pH e a condutividade elétrica foram determinados na implantação do experimento e a cada dois dias com auxílio de pHgâmetro e condutivímetro digital da marca Hanna®. Os valores de pH foram mantidos entre 5,5 e 7,0 e a condutividade elétrica na faixa de 2,0 a 2,5 mS m⁻¹.

A mesa de produção foi constituída de tubos de polipropileno de 6 m de comprimento, com calhas de recolhimento de solução nutritiva, e motobomba para fazer a sucção da solução. A solução nutritiva foi armazenada em caixa de água de 500 litros.

Aos 25 dias após o transplante foram avaliadas a altura das mudas mensurada com régua milimétrica, da base até a última folha completamente expandida; número de folhas contadas da base até a última folha completamente expandida. Para determinação da massa verde e seca da parte aérea e raiz foi utilizado balança de precisão (0,0001 g). Posteriormente, o material foi acondicionado na estufa com circulação de ar forçada a 65°C até massa constante, para determinação da massa seca da parte aérea e raiz. O comprimento da maior raiz foi obtido com régua milimétrica, medindo-se do colo a extremidade da raiz mais longa. Todas as avaliações foram realizadas com quatro mudas por unidade experimental.

Os dados foram submetidos à análise da variância (Teste F) e as médias comparadas pelo teste Scott Knott ($p \leq 0,05$), utilizando-se software estatístico R.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a altura das mudas de lúpulo as estacas com 9 cm e na dose 1500 mg L⁻¹ apresentaram a melhor resposta de crescimento em altura (Tabela 1). As estacas de 5 e 7 cm não apresentaram diferenças significativas nas doses de AIB avaliadas.

Nas estacas com 9 cm e na dose de 1500 mg L⁻¹ verificou-se incremento em altura de 15,6% a mais do que a dose 500 mg L⁻¹ e 13,4% a mais que na dose 0 mg L⁻¹ de AIB.

Como parâmetro mínimo de altura das mudas para o transplante no campo é de 15 cm (Wendling e Dutra, 2010), todos os tratamentos atenderam as condições de altura adequada para o transplante a campo. A altura é um dos parâmetros mais utilizados na classificação e seleção de mudas nos viveiros, sendo considerada como uma das mais importantes características para se estimar o potencial de desempenho das plantas no campo (Carneiro, 1995).

Tabela 1. Altura de mudas de lúpulo produzidas em função de diferentes tamanhos de estaca e doses de AIB.

Estacas (cm)/Doses	Altura (cm)			Média
	0 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1500 mg L ⁻¹	
5	19,08 aA*	19,91 aA	19,00 bA	19,3
7	20,00 aA	20,50 aA	18,58 bA	19,7
9	19,75 aB	19,25 aB	22,8 aA	20,6
Média	19,7	19,9	20,2	
C.V.%		7,63		

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram significativamente, pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Fonte: A autoria própria (2024).

Para número de folhas de mudas de lúpulo constatou-se que as estacas de 9 cm resultaram em maior número de folhas (13,61), e os demais tamanhos de estacas

não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 2). O maior número de folhas em estacas com 9 cm de comprimento está relacionado ao maior número de raízes e ao maior comprimento da maior raiz. Somente ocorre a formação de folhas se houver emissão de raízes adventícias, que fornecem suprimento nutricional e hídrico (Hartmann et al., 2011).

Tabela 2. Número de folhas de mudas de lúpulo produzidas em função de diferentes tamanhos de estaca.

Comprimento de estacas (cm)	Número de folhas
5	10,11 b*
7	10,44 b
9	13,61 a
Média	11,39
C.V.(%)	10,57

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram significativamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Autoria própria (2024).

Verificou-se que as doses de AIB influenciaram significativamente o número de folhas, sendo que o maior número de folhas (13,27) foi observado na dose de 1500 mg L⁻¹ (Tabela 3).

Tabela 3. Número de folhas de mudas de lúpulo produzidas em função de diferentes doses de AIB.

Doses de AIB (mg L⁻¹)	Número de folhas
0	10,30 b*
500	10,58 b
1500	13,27 a
Média	11,38
C.V.%	10,76

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram significativamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Autoria própria (2024).

O comprimento de estacas influenciou significativamente o comprimento da maior raiz. Estacas com 9 cm de comprimento resultaram em maior comprimento da raiz (Tabela 4). O menor comprimento da maior raiz foi verificado nas estacas com 5 cm de comprimento.

Tabela 4. Comprimento da maior raiz de mudas de lúpulo produzidas em função de diferentes tamanhos de estaca.

Comprimento de estacas (cm)	Comprimento da maior raiz (cm)
5	6,47 c*
7	6,58 b
9	7,22 a
Média	6,76
C. V.(%)	9,45

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram significativamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Autoria própria (2024).

Com relação ao comprimento da maior raiz de lúpulo verificou-se que na dose de 1500 mg L⁻¹ ocorreu maior crescimento da maior raiz (7,77 cm) (Tabela 5). O menor comprimento da maior raiz foi constatado na dose zero de AIB. A aplicação de auxina pode proporcionar maior velocidade de formação, qualidade e uniformidade do sistema radicial, neste caso evidenciado pelo aumento do comprimento da maior raiz (Hartmann et al., 2011). Nesse sentido, a emissão de raízes em maior número e comprimento é fundamental quando o objetivo é a produção de mudas em escala comercial, que resulta em maior percentual de pagamento das mudas no campo (Zietemann e Roberto, 2007).

Tabela 5. Comprimento da maior raiz de mudas de lúpulo produzidas em função de diferentes doses de AIB.

Doses de AIB (mg L ⁻¹)	Comprimento da maior raiz (cm)
0	6,16 c *
500	6,63 b
1500	7,77 a
Média	6,85
CV%	9,62

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram significativamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Autoria própria (2024).

Para variável massa fresca da parte aérea as estacas de 5 e 7 cm obtiveram os melhores resultados na dose de 500 mg L⁻¹ de AIB (Tabela 6). Para as estacas de 9 cm a dose de 1500 mg L⁻¹ de AIB resultou em maior acúmulo de biomassa. Também, podem ter contribuído para os resultados de maior biomassa, o maior crescimento em altura e o maior número de folhas nesse tratamento.

Braga et al., (2006) verificaram que o comprimento da estaca de maracujazeiro (*Passiflora edulis*) influenciou nas reservas de carboidratos, bem como no volume de auxinas endógenas, isso ocasionou maior sobrevivência, e maior número e tamanho das brotações durante o período inicial de crescimento.

Tabela 6. Massa fresca da parte aérea de mudas de lúpulo produzidas em função de diferentes tamanhos de estaca e doses de AIB.

Estacas (cm)/ Doses	Massa Fresca parte aérea (g planta ⁻¹)			
	0 mg L ⁻¹	500 mg/L	1500 mg/L	Média
5	2,30 aB	2,39 aA	2,32 bB	2,34
7	2,32 aB	2,40 aA	2,34 bB	2,35
9	2,33 aB	2,37 aB	2,43 aA	2,38
Média	2,32	2,39	2,36	
CV%		1,02		

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram significativamente, pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Autoria própria (2024).

Para variável massa seca da parte aérea verificou-se que o tamanho de estaca de 9 cm e a dose de 1500 mg L⁻¹ resultaram em maior acúmulo de massa seca da parte aérea (Tabela 7). Os tamanhos de estaca 5 e 7 cm e as doses 0 e 500 mg L⁻¹, não apresentaram diferença significativa. O incremento de biomassa seca com a dose de 1500 mg L⁻¹ foi de 15,4% em relação a dose 0 mg L⁻¹ de AIB.

Tabela 7. Massa seca da parte aérea de mudas de lúpulo produzidas em função de diferentes tamanhos de estaca e doses de AIB.

Estacas (cm)/ Doses	Massa Seca Parte Aérea (g planta ⁻¹)			Média
	0 mg L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	1500 mg L ⁻¹	
5	0,22 aA*	0,23 aA	0,21 bA	0,22
7	0,21 aA	0,23 aA	0,22 bA	0,23
9	0,22 aB	0,24 aB	0,26 aA	0,24
Média	0,22	0,23	0,23	
CV%	2,37			

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram significativamente, pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Autoria própria, 2024.

A percentagem de enraizamento das estacas foi de 100% para todos os tratamentos avaliados. Para Gomes (2018) o maior desempenho vegetativo ocorre em estacas de lúpulo com folhas do que na ausência das mesmas, garantindo enraizamento e brotação; resultando em maior massa fresca e conseqüentemente massa seca, devido aos fotoassimilados gerados nas folhas. No experimento, foram utilizadas estacas com a presença de uma folha por estaca, o que pode ter contribuído para os resultados de enraizamento de estacas.

De acordo com Lima et al., (2007), para alto percentual de enraizamento de estacas, a presença de folhas em estacas é fundamental, pois alteram a disponibilidade de auxinas e fotoassimilados para a formação das raízes, favorecendo assim o enraizamento.

Resultados semelhantes foram obtidos por Karimi et al. (2014) que avaliaram o efeito das concentrações (0; 100; 250 e 500 mg L⁻¹ de AIB) no enraizamento e crescimento de mudas de tomilho (*Thymus satuireioides*, Lamiaceae) e constataram que na concentração de 500 mg L⁻¹ de AIB, as plantas que apresentaram a maior altura corresponderam em maior biomassa aérea. Os autores afirmam que o crescimento superior das raízes nesse tratamento contribuiu para o crescimento da parte aérea.

Também Biasi e Costa (2003) avaliando a propagação vegetativa de *Lippia alba* por meio de estacas de diferentes comprimentos (5, 10, 15 e 20 cm) observaram que o

aumento do tamanho da estaca proporcionou aumento linear nas variáveis percentagem de enraizamento e número de raízes emitidas por estaca, sendo que, todas as estacas de 20 cm enraizaram, o que foi atribuído pelos autores, à maior quantidade de reservas de carboidratos presentes nas estacas maiores, que seriam utilizadas para a formação de brotos e de raízes novas (Hartmann et al., 2011).

Para a variável massa fresca da raiz, no tamanho de estaca 5 e 7 cm; e na dose de 500 mg L⁻¹ resultaram em maior ganho de massa fresca da raiz (Tabela 8). Para estacas com 9 cm de comprimento e a dose de 1500 mg L⁻¹ apresentou os melhores resultados de massa fresca da raiz.

Tabela 8. Massa fresca da raiz de mudas de lúpulo produzidas em função de diferentes tamanhos de estaca e doses de AIB.

Estacas (cm)/ Doses	Massa Fresca Raiz (g planta ⁻¹)			
	0 mg L ⁻¹	500 mg/L	1500 mg/L	Média
5	1,61 aB*	1,70 aA	1,64 bB	1,65
7	1,64 aB	1,71 aA	1,66 bB	1,67
9	1,65 aB	1,72 aB	1,76 aA	1,71
Média	1,63	1,71	1,68	
CV%	5.7			

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferenciam significativamente, pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Autoria própria (2024).

Com relação à massa seca da raiz houve diferença significativa entre os tratamentos avaliados (Tabela 9). Estacas de 9 cm de comprimento e a dose de 1500 mg L⁻¹ apresentaram os melhores resultados de massa seca da raiz. A massa seca das raízes é um parâmetro importante na avaliação do vigor da estaca, onde estacas com poucas reservas têm baixo vigor (Lima et al. 2006), verificou-se que estacas com 9 cm de comprimento apresentaram mais reservas, o que resultou em maior acúmulo de massa seca da raiz.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com Bona et al. (2010) com a propagação vegetativa de lavanda (*Lavandula dentata*, Lamiaceae) verificou que a massa seca de raízes aumentou proporcionalmente com as concentrações de AIB (0; 500; 1000; 2000; 3000 mg L⁻¹), as raízes tratadas com as doses mais elevadas de AIB apresentaram qualidade superior, sendo mais densas e bem formadas, característica desejável no momento do plantio da muda a campo. Observou-se que o AIB melhorou a qualidade das raízes, sendo estas bem formadas e ramificadas.

Tabela 9. Massa seca da raiz de mudas de lúpulo produzidas em função de diferentes tamanhos de estaca e doses de AIB.

Estacas (cm)/ Doses	Massa Seca da raiz (g planta ⁻¹)			Média
	0 mg L ⁻¹	500 mg/L	1500 mg/L	
5	0,16 aA*	0,18 aA	0,19 bA	0,18
7	0,18 aA	0,19 aA	0,19 bA	0,19
9	0,19 aB	0,18 aB	0,23 aA	0,20
Média	0,18	0,18	0,20	
CV%	4,5			

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferenciam significativamente, pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Fonte: Autoria própria (2024).

4 CONCLUSÃO

A propagação vegetativa de lúpulo com estacas de 9 cm de comprimento e a dose de 1500 mg L⁻¹ de AIB resultaram em maior altura, número de folhas, comprimento da maior raiz, massas fresca e seca da parte aérea e da raiz.

A propagação de lúpulo por meio de hidroponia pode ser viável, uma vez que se obtém mudas saudáveis e em período curto de tempo (25 dias).

REFERÊNCIAS

- ALVARES, C. A. et al. **Koppen's climate classification map for Brazil**. Meteorologische Zeitschrift, Stuttgart, n. 22, p.711-728, 2013.
- BIASI, A.L; COSTA, G. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Ciência Rural**, v. 33, p. 455-459, 2003.
- BONA, C.M; MASETTO, M.A.M; BIASI, L.A; DESCHAMPS, C. Rooting induction of different *Lavandula angustifolia* accessions by auxin application. **Semina**, v. 33, p.175-182, 2012.
- BRAGA, M. F. et al. Enraizamento de estacas de três espécies silvestres de *Passiflora*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 284-288, 2006.
- CARNEIRO, J.G.A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais**. Curitiba: UFPR. 1995, 451p.
- COELHO, M.F.B; MESSIAS, U. Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de alecrim. **Horticultura Brasileira**, v.18, p. 933-934, 2000.
- CANBAS, A.; ERTEN H.; OZSAHIN, F. The effects of storage temperature on the chemical composition of hop pellets. **Process Biochemistry**, v.36, n.11, p. 1053-1058, 2001.
- FACHINELLO, JC; HOFFMANN, A; NACHTIGAL, JC. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: EMBRAPA. 2005. 221p.
- FARAG, M. A.; WESSJOHANN, L. A. Cytotoxic effect of commercial *Humulus lupulus* L. (hop) preparations: In comparison to its metabolomic fingerprint. **Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 4, p. 417 – 421, 2013.

FURLANI, P. R. **Instruções para o cultivo de hortícolas de folhas pela técnica de hidroponia - NFT**. Campinas: IAC, 1998. 30p. (IAC. Boletim Técnico, 168).

GOMES, E. M.; MACHADO, M. P.; MIOLA, J.; DESCHAMPS, C. Leaf area and intermittent misting on hop plants propagation by stem cuttings. **Revista Colombiana de Ciências Horticolas**, v. 12, n. 2, p. 508-513, 2018.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, R.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8ª ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011, 915p.

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. **Dados da Estação de Dois Vizinhos**. Disponível em: http://www.inmet.gov.br/sonabra/pg_dspDadosCodigo_sim.php?QTg0Mw>. Acesso em: 02 nov 2019.

KARIMI, M.; BERRICHI, A.; BOUKROUTE, A. Study of vegetative propagation by cuttings of *Thymus satureioides*. **Journal of Materials Environmental Science**, v.5, p. 1320-1325, 2014.

LIMA, R.L.S.; SIQUEIRA, D. L.; WEBER, O.B.; CAZETTA, J.O. Comprimento de estacas e parte do ramo na formação de mudas de aceroleira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.1, p.83-86, 2006.

LIMA, D.M.; ALCANTARA, G.B.; FOGAÇA, L.A.; QUOIRIN, M.; CUQUEL, F.L.; BIASI, L.A. Influência de estípulas foliáceas e do número de folhas no enraizamento de estacas semilenhosas de maracujazeiro-amarelo nativo. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 29, p. 671-676, 2007.

LIMA, C. S. L.; GONÇALVES, M. A.; TOMAZ, Z. F. P.; RUFATO, A. de R.; FACHINELLO, J. C. Sistemas de tutoramento e épocas de transplante de physalis. **Ciência Rural**, v. 40, n. 12, p. 2472-2479, 2010.

MARCOS, J. A. M. et al. **Guia del cultivo del lúpulo**. 2011. Disponível em: <<http://www.lutega.com/pdf/guiacultivo.pdf>>. Acesso em: 23 mai 2018.

RODRIGUES, M.A.; MORAIS, J. S.; CASTRO, J. P. M. **Jornada de lúpulo e cerveja: novas oportunidades de negócios**. Bragança: Livro de Atas. 2015. Disponível em: <<https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/11625>>. Acesso em: 23 mai 2018.

SANTOS, C. **Cultivo hidropônico: uma prática eficiente e de alta rentabilidade**. 2015. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/cprural/boapratica/mostra/97/cultivo-hidroponico-uma-pratica-eficiente-e-de-alta-rentabilidade.html>>. Acesso em: 5 jun 2018.

SILVA, P.H.A.; FARIA, F.C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.4, p. 902-906, out./dez. 2008.

ZIETEMANN, C.; ROBERTO, SR. Efeito de diferentes substratos e épocas de coleta no enraizamento de estacas herbáceas de goiabeira, cvs. Paluma e Século XXI. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, p. 31-36, 2007.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F. **Produção de mudas de eucalipto por sementes**. In: Wendling, I.; Dutra, L.F. (Eds.) Produção de mudas de eucalipto. pp.13-47. Colombo: Embrapa Florestas, 2010.

CAPÍTULO 5

DETECCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS CONTRA *ANAPLASMA MARGINALE* EN BOVINOS DE TRES ESTADOS DE MÉXICO¹

Data de submissão: 20/06/2024

Data de aceite: 04/07/2024

Elizabeth Salinas Estrella

INIFAP CENID-SAI, sede Jiutepec
Morelos, México
<https://orcid.org/0000-0002-0503-6577>

Mayra Elizeth Cobaxin Cárdenas

INIFAP CENID-SAI, sede Jiutepec
Morelos, México
<https://orcid.org/0000-0001-9984-2715>

Roberto Omar Casteñada Arriola

INIFAP CIRGOC, C.E. Huimanguillo
Sitio Experimental Pichucalco, México
<https://orcid.org/0000-0002-0739-3922>

Itzel Amaro Estrada

INIFAP CENID-SAI, sede Jiutepec
Morelos, México
<https://orcid.org/0000-0002-6386-9526>

Sergio Darío Rodríguez Camarillo

INIFAP CENID-SAI, sede Jiutepec
Morelos, México
<https://orcid.org/0000-0003-1316-5739>

RESUMEN: La anaplasmosis bovina es una enfermedad producida por la bacteria intraeritrocítica *Anaplasma marginale*, de gran importancia económica y clínica en la ganadería bovina. Esta enfermedad se transmite por insectos hematófagos y garrapatas, además puede transmitirse de forma iatrogénica mediante el uso de instrumentos o equipo contaminado con sangre infectada, o de forma vertical, de la hembra gestante a la cría, con diferentes desenlaces de acuerdo al estado inmune de los animales. La anaplasmosis bovina se distribuye ampliamente en el mundo en zonas de clima tropical por la presencia del vector biológico, las garrapatas, así como en zonas de clima templado debido a bajos estándares de manejo que facilitan la transmisión iatrogénica o por un inadecuado monitoreo de los hatos para determinar la presencia del patógeno, lo cual puede contribuir a la permanencia en los hatos debido a la transmisión vertical. En México, la prevalencia serológica y molecular de anaplasmosis bovina es superior al 50% en las regiones cálidas, principalmente Estados costeros, mientras que, en los Estados del Norte del país, la prevalencia suele ser menor al 25%. En este trabajo, se detectaron prevalencias superiores al 75% en muestras obtenidas de tres hatos, originarios de Chiapas, Guerrero y Jalisco, mediante ELISA indirecta. La finalidad del estudio fue verificar si la detección serológica de anticuerpos contra *A. marginale* en los tres hatos de

¹ Los datos mostrados en este trabajo corresponden a resultados parciales y forman parte de los productos generados con los Proyectos INIFAP #1217283091, del 2018, #1162734713 del 2019 al 2022 y #1515235065 del 2019 al 2023, financiados con recursos fiscales. Los autores declaran no haber conflicto de interés.

diferentes Estados del país coincidía con las prevalencias reportadas de anaplasmosis en esos Estados.

PALABRAS CLAVE: Anaplasmosis. Anticuerpos. Inmunoprotección. Diagnóstico. Prevalencia.

DETECTION OF IMMUNOGLOBULINS AGAINST *ANAPLASMA MARGINALE* IN CATTLE FROM THREE STATES OF MEXICO

ABSTRACT: Bovine anaplasmosis is a disease caused by the intraerythrocytic bacterium *Anaplasma marginale*, of great economic and clinical importance in cattle breeding. This disease is transmitted by hematophagous insects and ticks. It can also be transmitted iatrogenically through the use of instruments or equipment contaminated with infected blood, or vertically, from the pregnant female to the offspring, with different outcomes according to the immune status of the animals. Bovine anaplasmosis is widely distributed in the world in tropical climate zones due to the presence of the biological vector, ticks, as well as in temperate climate zones due to low management standards that facilitate iatrogenic transmission or inadequate monitoring of herds to determine the presence of the pathogen, which can contribute to the permanence in herds due to vertical transmission. In Mexico, the serological and molecular prevalence of bovine anaplasmosis is higher than 50% in warm regions, mainly coastal states, while in the northern states of the country, prevalence is usually less than 25%. In this work, prevalences higher than 75% were detected in samples obtained from three herds, from Chiapas, Guerrero and Jalisco, by indirect ELISA. The purpose of the study was to verify if the serological detection of antibodies against *A. marginale* in the three herds from different states of the country coincided with the reported prevalences of anaplasmosis in those states.

KEYWORDS: Anaplasmosis. Antibodies. Immunoprotection. Diagnosis. Prevalence.

1 INTRODUCCIÓN

La bacteria *Anaplasma marginale*, perteneciente al orden de los Rickettsiales, es el patógeno causante de la anaplasmosis bovina en México, cuyos signos clínicos más notorios son fiebre, disminución de la ingesta, anemia, disminución o pérdida de la producción de leche, disminución en la producción de carne, posibilidad de aborto en el tercer tercio de la gestación y muerte en animales adultos, presentando cuadros crónicos en los animales que sobreviven a la primera infección con ictericia o palidez de mucosas y reincidencias cíclicas cada 6 a 8 semanas (Salinas-Estrella *et al*, 2023).

Esta enfermedad está ampliamente distribuida en el mundo y, en nuestro país, se presenta principalmente (aunque no se limita) en zonas con clima tropical o subtropical, las cuales son el lugar donde la garrapata común del ganado, *Rhipicephalus microplus* (Cobaxin-Cárdenas *et al*, 2019), prolifera en mayor medida por las condiciones óptimas de calor y humedad. La distribución de la garrapata está estrechamente relacionada, ya que es el vector biológico de la bacteria (Amaro-Estrada *et al*, 2020), sin embargo,

en otros países se han detectado otras especies transmisoras de anaplasmosis, como *Dermacentor spp* (Estrella *et al*, 2022), por lo que se cree que especies de este género puedan estar involucradas en su transmisión en México, coadyuvando en una mayor distribución de la enfermedad. Aunado a esto, una forma muy común de transmisión o dispersión de la anaplasmosis bovina es mediante el uso de instrumental (agujas, navajas, etc.) contaminado con sangre infectada en dos o más animales (Salinas-Estrella *et al*, 2023). Asimismo, las moscas y los tábanos pueden actuar como vectores mecánicos, llevando sangre infectada de un animal a otro (Bautista-Garfias *et al*, 2021).

Finalmente, otra forma de transmisión de la anaplasmosis bovina es de la vaca a la cría; el pronóstico dependerá del estado inmunológico de la vaca, así como el manejo general del hato, puesto que situaciones de estrés (cambios climáticos severos, excesivo movimiento de ganado, o presencia de otras enfermedades) pueden desencadenar una inmunodepresión que facilite brotes de anaplasmosis en lugares aparentemente controlados.

Con la intervención de todos estos factores se considera que la anaplasmosis bovina tiene una prevalencia de más del 50% en la mayoría de los estados costeros de la República Mexicana (Rodríguez *et al*, 2009).

2 OBJETIVO

En el presente trabajo se obtuvieron muestras de tres hatos localizados en tres estados diferentes: Chiapas, Guerrero y Jalisco, con el objetivo de confirmar si la detección serológica de productos de la respuesta inmune contra *Anaplasma marginale* coincidía con la prevalencia reportada para los mismos Estados y, más adelante, evaluar las diferencias en las proporciones de inmunoglobulinas indicativas de una respuesta inmune protectora contra la anaplasmosis bovina.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

La obtención de muestras de sangre se realizó a disponibilidad de personas encargadas de hatos amenas a permitir el muestreo de los bovinos. Se realizó la toma de muestras utilizando el sistema Vacutainer® con tubos sin anticoagulante. Los tubos se dejaron reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora y, en algunos casos fueron almacenados en refrigeración por unas horas. Se centrifugaron a 4500 rpm, durante 10 min en centrífuga clínica. Se realizaron alícuotas de los sueros sanguíneos obtenidos y se mezclaron con glicerina (v/v) para promover una mejor conservación de los componentes serológicos.

Se realizó un ensayo de ELISA indirecta utilizando el paquete PAdianaVET (INIFAP), utilizando placas de poliestireno fijadas con antígeno crudo de *A. marginale* (Preciado de la Torre et al, 2021; Salinas-Estrella et al, 2022). Las lecturas de densidad óptica se analizaron en un paquete informático de hoja de datos para obtener el punto de corte, así como el índice de positividad de cada muestra (Salinas-Estrella et al, 2022).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron un total de 297 muestras de suero sanguíneo de bovinos. De estas, 87 provenían del Estado de Guerrero, 63 de Jalisco y 147 de Chiapas. Sin embargo, de las 87 muestras del Estado de Guerrero, dos de ellas no estaban identificadas, por lo que esas muestras se eliminaron del análisis final, asimismo, 5 de las muestras de Jalisco no se pudieron probar. En el cuadro 1 se resumen resultados de las muestras analizadas.

Cuadro 1. Recuento de muestras analizadas, positivas y negativas.

Estado de origen	Núm. muestras obtenidas	Muestras viables para análisis	Muestras positivas	Muestras negativas	Prevalencia
Chiapas	147	147	134	13	91.16%
Guerrero	87	85	65	20	76.47%
Jalisco	63	58	51	7	87.93%
Totales	297	290	250	40	86.21%

Al realizar el ensayo de ELISA indirecta, se obtuvieron los índices de positividad que se observan en las figuras 1, 2 y 3, por cada Estado.

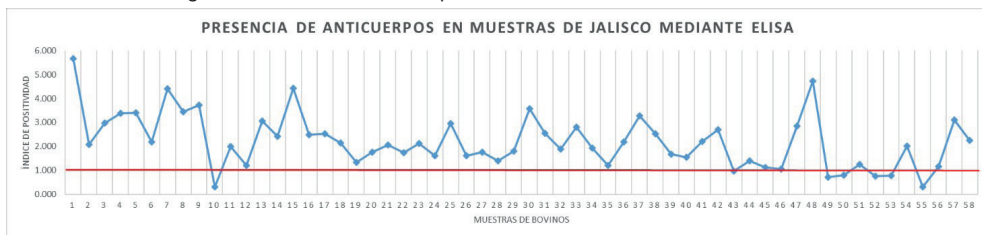
Figura 1. Presencia de anticuerpos en muestras de Chiapas mediante ELISA.



Figura 2. Presencia de anticuerpos en muestras de Guerrero mediante ELISA.



Figura 3. Presencia de anticuerpos en muestras de Jalisco mediante ELISA.



Las prevalencias obtenidas por grupo de bovinos (por Estado) se observan en la figura 4. Estas prevalencias, a pesar de ser de un solo grupo de animales por cada Estado, coinciden con la distribución de la anaplasmosis (figura 5) reportada en la literatura para el Estado de Chiapas, no así para los Estados de Guerrero y Jalisco, puesto que las prevalencias obtenidas fueron mayores a las reportadas (Rodríguez *et al*, 2009).

Figura 4. Muestras positivas a anticuerpos contra *A. marginale*.

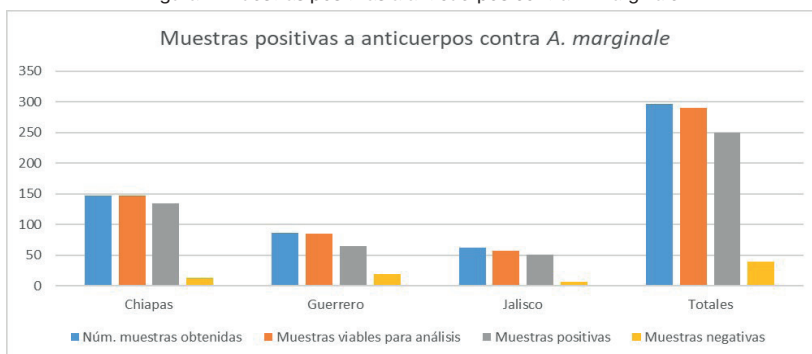
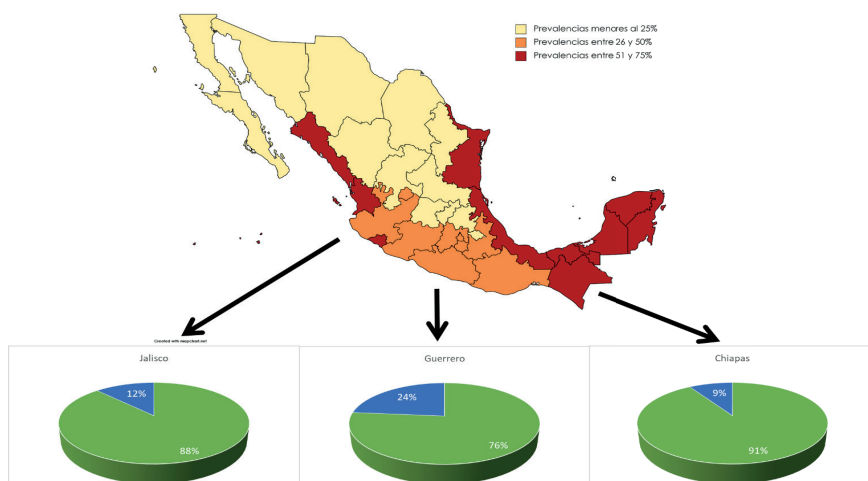


Figura 5. Comparación de prevalencias obtenidas en los hatos de tres Estados de México, con la prevalencia serológica conocida (colores rojo, naranja y amarillo en el mapa representan alta, media y baja prevalencia) de la anaplasmosis bovina en México (Imagen modificada de Preciado de la Torre *et al*, 2021).



5 CONCLUSIONES

Los hatos de los cuales se obtuvieron las muestras de suero se encuentran en zonas enzoóticas de anaplasmosis bovina, con prevalencias superiores al 50%. A pesar de no ser un muestreo amplio de la población ganadera de México o de cada Estado, sí indica que el problema de la anaplasmosis es vigente y de gran magnitud, por lo que es necesario seguir trabajando en estrategias para controlar y disminuir su impacto en la producción bovina.

6 PERSPECTIVAS

Los sueros obtenidos serán analizados para determinar la proporción IgG1/IgG2, de manera que puedan ser un indicativo del tipo de respuesta inmune desarrollada por cada bovino. Lo cual podría aumentar la profundidad de análisis sobre cada región para determinar si las cepas de *A. marginale* presentes en cada lugar se mantienen en estabilidad enzoótica o representan un problema de infecciones cíclicas con cuadro clínicos graves.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaro Estrada, I., García-Ortiz, M. A., Preciado de la Torre, J. F., Rojas-Ramírez, E. E., Hernández-Ortiz, R., Alpírez-Mendoza, F., & Rodríguez Camarillo, S. D. (2020). Transmission of *Anaplasma marginale* by unfed *Rhipicephalus microplus* tick larvae under experimental conditions. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 11(1), 116-131.

Bautista-Garfias, C. R., Castañeda-Ramírez, G. S., Torres-Acosta, J. F. J., Salinas-Estrella, E., Moshin, M., Aguilar-Marcelino, L. (2021). Fly borne diseases in animals. In: Abbas RZ and Khan A, editors. *Veterinary Pathobiology and Public Health*. 114-127.

Cobaxin-Cardenas, M. E., Díaz, H. A., Avelino, P. O., Salinas-Estrella, E., Preciado-de la Torre, J. F., Quiroz-Castañeda, R. E., ... & Rodríguez-Camarillo, S. (2019). Primer abordaje para la propagación de *Anaplasma marginale* (MEX-31-096) en células de garrapata Rm-sus. *Revista del Centro de Investigación de la Universidad la Salle*, 13(51), 67-80.

Estrella, E. S., Cárdenas, M. E. C., de la Torre, J. F. P., Bayúgar, R. C., & Camarillo, S. D. R. (2022). Morfología, Incubación, y Oviposición in Vitro de la Garrapata *Dermacentor albipictus*1. *Southwestern Entomologist*, 47(2), 471-480.

Preciado TJF, Salinas EE, Cobaxin CME, Amaro EI, Quiroz CRE, Rodríguez CSD. 2021. Detección serológica de animales en contacto con *Anaplasma marginale* mediante el ensayo inmunoenzimático PADianaVET. INIFAP CENID-SAI. Folleto técnico #24. Jiutepec, Morelos, México.

Rodríguez SD, García Ortiz MA, Jiménez Ocampo R, Vega y Murguía CA. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in Mexico. *Infect Genet Evol*. 2009 Dec; 9(6):1092-101. doi: 10.1016/j.meegid.2009.09.007. Epub 2009 Sep 26. PMID: 19786123.

Salinas Estrella, E., Ortega Hernández, M. G., Flores Pérez, E., Montenegro Cristino, N., Preciado de la Torre, J. F., Cobaxin Cárdenas, M. E., & Rodríguez, S. D. (2022). Antigen production and standardization of an in-house indirect ELISA for detection of antibodies against *Anaplasma marginale*. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 13(4), 1079-1094.

Salinas-Estrella, E., Amaro-Estrada, I., Cobaxin-Cárdenas, M. E., & Rodríguez-Camarillo, S. D. (2023). Bovine Anaplasmosis: Diagnosis, Treatment and Control Strategies. *One Health Triad*, Unique Scientific Publishers, Faisalabad, Pakistan, 2, 94-101.

CAPÍTULO 6

NUTRIENT USE EFFICIENCY EVALUATION OF BEEF CATTLE FEEDLOT

Data de submissão: 20/06/2024

Data de aceite: 04/07/2024

Andrea Wingartz Otaduy

National Autonomous University of Mexico
Veterinary Medicine and Zootechnics
Mexico City, Mexico
<https://orcid.org/0000-0003-2791-7954>

Rafael Olea Pérez

National Autonomous University of Mexico
Veterinary Medicine and Zootechnics
Mexico City, Mexico
<https://orcid.org/0000-0002-5310-0414>

José Luis Dávalos Flores

National Autonomous University of Mexico
Veterinary Medicine and Zootechnics
Mexico City, Mexico
<https://orcid.org/0000-0003-4524-5207>

María Edna Álvarez Sánchez

Autonomous University of Chapingo
Soils and Agriculture
Texcoco, Mexico
<https://orcid.org/0000-0001-5484-5269>

ABSTRACT: Feedlot's high-intensity operations achieve average daily gains of 1.36-1.9 kg, with peak values up to 2.5 kg. Despite the efficient dietary practices that maximize

digestibility and energy, feedlot systems are highly dependent on imported feed, making them susceptible to market fluctuations and posing environmental challenges due to nutrient waste. This study evaluates the Nutrient Use Efficiency (NUE) of Dry Matter (DM), Nitrogen (N), and Phosphorus (P) in a central Mexican feedlot with a maximum capacity of 8,000 animals, aimed at quantifying nutrient retention as live weight gain (LWG). A mass balance methodology was used to assess nutrient inputs and outputs over one year. The results indicated that the NUE was 15% for DM, 17% for N, and 29% for P, with the majority of nutrients lost in feed waste, manure and energy for maintenance. The findings suggest that while improvements in feed management, infrastructure, and genetic and sanitary measures can slightly enhance NUE, substantial gains are limited to about 5%. The most significant opportunity for improving overall NUE and reducing environmental impact lies in revaluing manure as a co-product rather than waste. Effective manure management can retain more nutrients within the system, thereby enhancing the efficiency and sustainability of feedlot operations. This comprehensive assessment underscores the importance of targeted strategies to optimize nutrient use in feedlots, highlighting the potential benefits of treating manure as a valuable resource.

KEYWORDS: Feedlot nitrogen efficiency. Feedlot phosphorus efficiency. Mass balance feedlot.

1 INTRODUCTION

Feedlots are characterized by the high intensity with which liveweight gains are attained, reaching 1.36-1.9 kg of average daily gain (ADG) and up to 2.5 kg (NRC, 2000). Achieving these ADGs requires a series of management practices, the most influential factor has been established to be the dietary composition, providing high digestibility, energy and protein, as well as growth promoters (Berthiaume et al., 2006; Gorocica-Buenfil & Loerch, 2005). To supply these complex diets in the large quantities, feedlots permanently import prime matters, such as grains and forages. Relying entirely on imported feed for production, feedlots are inherently dependent systems, making them susceptible to agricultural and market fluctuations (Cheng et al., 2022). Additional to the vulnerability the dependency confers, feedlots face challenges associated with the environmental impacts generated, mainly arising from the fractions of Dry matter (DM), Nitrogen (N) and Phosphorus (P) that are not retained as weight gain, and therefore result in wasted nutrients (Cheng et al., 2022). DM and N released to the environment contribute to livestock greenhouse gases emissions as nitrous oxides and methane. Conversely, N and P losses affect air quality, generate aquatic and terrestrial acidification and eutrophy marine and freshwater environments (Angelidis et al., 2019). Thereby, assessing the amount of nutrients that are transformed into weight gain and the amount considered waste is important not only to develop dietary management plans to minimize losses, but also to reduce the consequential emissions. The portion of nutrients retained in the end product (weight gain) is commonly referred to as Nutrient Use Efficiency (NUE) (Vaneekhaute et al., 2014). The NUE is obtained through mass balance assessments, which determine the difference between nutrient inputs and outputs. Mass balance studies are a first approach into the comprehensive analysis of NUE, providing with a quantitative framework to estimate and identify nutrient flows (Homolka et al., 2021). This methodology has been widely applied in the agricultural sector, and feedlot productions, since it has proven to be simple, flexible and an affordable tool in the pursuit towards more efficient production (Luebbe et al., 2012; Rout & Behera, 2021).

Feedlot management practices vary significantly in terms of feeding ingredients, quantities, geographical region, breed, and other factors. Consequently, developing a mass balance for the specific feedlot targeted for improvement is essential. The aim of the present study was to estimate the NUE of DM, N and P in a specific feedlot and to quantify the portions of each nutrient that are not utilized and thus contribute to emissions.

2 MATERIALS & METHODS

A feedlot mass balance was conducted, evaluating the DM, N and P inputs and outputs for one year of operation. The feedlot assessed as a case study was located in central Mexico, where the mean annual temperature is 17 °C (3.4°C min. -31.2°C max.), mean annual precipitation 700mm, and evapotranspiration potential 1,600mm. The feedlot had a maximum capacity for 8,000 animals, and the fattening cycle consisted of six consecutive phases (Table 1), presenting an average initial weight of 240±50 kg and average final weight of 577±24 kg. After reaching final weight, the animals were sold as live cattle at farm´s gate.

Upon reception, every animal was subject to the sanitary protocol including veterinary evaluation, vaccination, deworming, implantation and medical treatment if necessary.

Table 1. Productivity parameters obtained through farm data analysis corresponding to one year´s activity; presented by fattening phase.

	Unit	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4	Phase 5	Phase 6*
Average weight	Kg	240 ± 50	266 ± 37	352 ± 53	429 ± 20	479 ± 31	542 ± 36
Duration	Days	7.2 ± 3.6	47±22.9	62±16.1	33±9.0	46±6.4	35±6.7
Average daily weight gain	Kg	0.44	1.6 ± 0.34	1.7 ± 0.45	1.2 ± 0.41	1.4 ± 0.38	1.85 ± 0.32
DM intake per animal	Kg day ⁻¹	4.5	6.7	8.2	9.6	9.7	10.5
ME intake per animal	Mcal day ⁻¹	9.5	11.8	15	23	27	29
Crude protein intake	% of DM	9	11	13	13.25	12.5	13
Phosphorus intake	% of DM	0.6	0.45	0.25	0.3	0.3	0.3

Where: ME= Metabolizable Energy, DM= Dry matter.

* Inclusion of Zilpaterol.

We considered tones of liveweight (LW) gain as the only product obtained from the process, stating that manure (the sum of feces and urine), feed waste, and mortalities were not included as co-products, nor included in the NUE, since these resources were not sold or applied as an asset to the system. The spatial boundaries were set to initiate with feed and livestock inputs, and encompass as far as livestock, manure, feed waste and mortalities as outputs. To conduct the calculations, the model detailed in Equation 1 was applied:

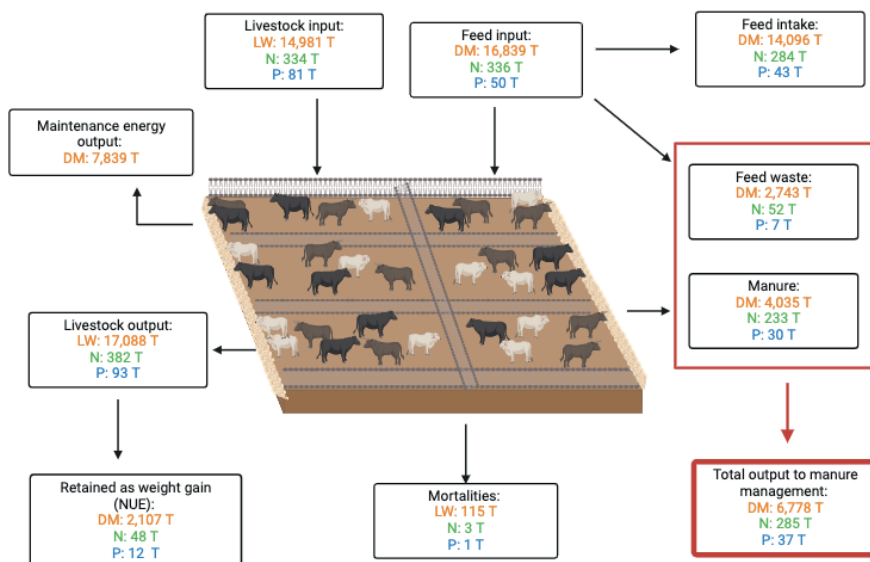
Equation 1. Mathematical model used to determine NUE (tonnes). Where: X = amount of nutrient, if = input as feed, ilw = input as liveweight, omt = output as mortalities, $omet$ = output through nutrient metabolism, $owas$ = output as feed waste and om = output as manure.

$$X_{NUE} = \Sigma [X_{if} + X_{ilw} - X_{omt} - X_{omet} - X_{owas} - X_{om}]$$

3 RESULTS AND DISCUSSION

Initial results are presented considering overall livestock and feed inputs, regardless of feed being consumed or dispatched as waste. For this matter, nutrients flows are presented in Figure 1, showing total inputs of 14,981 tonnes of LW, 16,839 tonnes of DM, 670 tonnes of N and 131 tonnes of P. The NUE for DM was only 13%, 15% for N and 24% for P, achieving a total LW gain of 2,107 tonnes. Tracking nutrient losses, we can determine that the largest output was attained by the compound of feed waste and manure, which represented 40% of the total DM that entered the system, 85% of total N and 74% of total P. This compound constitutes the prime matter that will enter the respective manure management system, a process that falls outside the scope of the present study. Another significant finding, is the loss of nutrients through feed waste, representing 16% of DM, 15% of N and 14% of P that entered the system, which is directly related to inadequate infrastructure and sub-optimal feed management practices. Considering the previous statement results were analyzed excluding feed waste parameters, providing insight only for the fraction of feed that was consumed.

Figure 1. Feedlot nutrient flow. Results of inputs and outputs for one year. Where: T = Tonnes, LW = Live weight, DM = Dry matter, N = Nitrogen, P = Phosphorus and NUE = nutrient use efficiency.



When nutrients corresponding to feed intake were considered as 100%, the NUE for DM was 15% (Figure 2). For this category, the primary output was the fraction of DM consumed as energy for maintenance (56%). Table 2 provides reference values from a standardized source, indicating that 58% of dry matter intake (DMI) is allocated to energy consumption for maintenance (ASAE, 2005). According to the NRC (2000) the two most influential factors affecting this allocation are genetics and mean environmental temperature, but even under optimal conditions, the allocation does not fall below 53%.

Figure 2. Distribution of dry matter intake allocated to corresponding output.

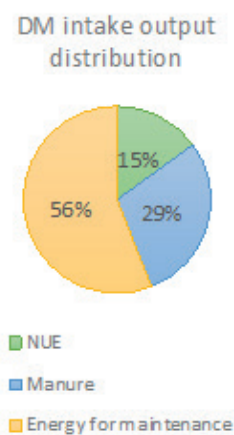


Figure 3. Distribution of nitrogen intake allocated to corresponding output.

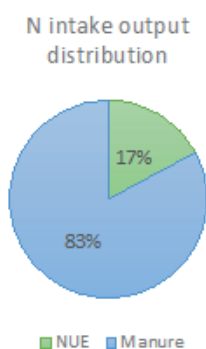
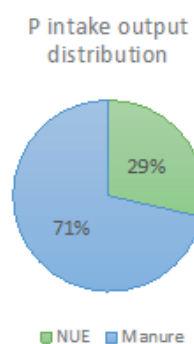


Figure 4. Distribution of phosphorus intake allocated to corresponding output.



As for N, NUE was 17% and 83% was excreted in manure (Figure 3), differing by only 2% from the reference values (Table 2). The percentage of nitrogen excreted increases with higher N intake (Luebbe et al., 2012). This was confirmed in a study where the crude protein (CP) content of the diet was raised from 13% to 17%, resulting in an increase in the excretion rate from 82% to 89% (Luebbe et al., 2012). More recent findings by Homolka et al. (2021) support this, showing that even with smaller increments in CP, from 14.4 to 16%, excretion increased from 86.5 to 87.5%. Studies consistently indicate that increasing dietary CP beyond 13.5% does not enhance live weight gain, but rather increases nitrogen excretion in manure (Homolka et al., 2021b; Luebbe et al., 2012; NRC, 2000).

For P the NUE was 29%, with 71% excreted (Figure 4), indicating a higher retention rate than the reference value (Table 2). The increased NUE may be related to the use of a more digestible P source in the present study, although this proposition cannot be conclusively validated due to insufficient information from the reference values. Similar to N, P excretion rises with increased intake. Authors observed that increasing P content in

DM from 0.33% to 0.49 resulted in an increase in P excretion from 73% to 81% (Luebbe et al., 2012). When the increment was from 0.32% to 0.33% excretion shifted from 79.8% to 80.7%, suggesting that a 0.01% increase in intake leads to a 1% increase in excretion. However, this relationship requires further measurements for validation (Homolka et al., 2021). The optimal intake range for P as a percentage of DM is 0.30%-0.35%; values exceeding this range result in wastage, thereby increasing the excretion percentage.

For feedlots under similar characteristics as the subject of this study, which provide high digestibility diets (>75%), include growth promoters and anabolic implants, the NUE has a low improvement margin (NRC, 2000). Regardless of the NUE, it is inevitable that the majority of the nutrients will ultimately end up in manure.

Table 2. Results of NUE and excretion rates for the present study and the corresponding reference values from a standardized source (ASAE, 2005). Where: DM = Dry matter, N = Nitrogen, P = Phosphorus, DMI = Dry matter intake, NUE = Nutrient use efficiency, CP = Crude protein, EM = Energy for maintenance, NI = Nitrogen intake, PI = Phosphorus intake.

Nutrient	Parameter	Present study	Reference values	Source
DM	DMI consumed for EM	56%	58%	(ASAE, 2005)
	NUE	15%	16%	
	DMI excreted in manure	29%	26%	
N	CP in DM	12.4%	13.4%	
	NUE	17%	15%	
	NI excreted in manure	83%	85%	
P	P in DM	0.32%	0.31%	
	NUE	29%	21.4%	
	PI excreted in manure	71%	78.6%	

4 CONCLUSIONS

Improving NUE in feedlots should be addressed with a comprehensive approach. Implementing adequate management practices and infrastructure to reduce feed waste, providing shade, ensuring optimal nutrient requirements and digestibility, and enhancing genetics and sanitary measures can positively influence NUE. However, feedlots similar to the one evaluated in this study are unlikely to achieve improvements greater than 5% in any of the evaluated categories (Homolka et al., 2021b; Larney & Hao, 2007; Luebbe et al., 2012; NRC, 2000). The most significant opportunity to optimize NUE lies in recognizing manure as a valuable resource. By improving manure management to enhance nutrient retention and shifting the perception of manure from waste to co-product, substantial improvements can be made in the overall production system's NUE and environmental burdens.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

We extend our gratitude to the Mexican National Council of Humanities, Science and Technology (CONAHCYT) for the grant given to the primary author to conduct this study. Additionally, we thank the National Autonomous University of Mexico for being the institution where the research took part. Lastly, we acknowledge and value the collaboration of Nutryplus SAPI de CV whose involvement served as the link between our team and the subject of our study.

REFERENCES

- Angelidis, A., Crompton, L., Misselbrook, T., Yan, T., Reynolds, C. K., & Stergiadis, S. (2019). Evaluation and prediction of nitrogen use efficiency and outputs in faeces and urine in beef cattle. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 280(April), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.04.013>
- ASAE. (2005). Manure production and characteristics. *American Society of Agricultural Engineers*, 4.
- Berthiaume, R., Mandell, I., Faucitano, L., & Lafrenière, C. (2006). Comparison of alternative beef production systems based on forage finishing or grain-forage diets with or without growth promotants: 1. Feedlot performance, carcass quality, and production costs. *Journal of Animal Science*, 84(8), 2168-2177. <https://doi.org/10.2527/jas.2005-328>
- Cheng, M., McCarl, B., & Fei, C. (2022). Climate Change and Livestock Production: A Literature Review. *Atmosphere*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/atmos13010140>
- Gorocica-Buenfil, M. A., & Loerch, S. C. (2005). Effect of cattle age, forage level, and corn processing on diet digestibility and feedlot performance. *Journal of Animal Science*, 83(3), 705-714. <https://doi.org/10.2527/2005.833705x>
- Homolka, M. N., Erickson, G. E., & Koelsch, R. K. (2021). *Predicting nitrogen and phosphorus balance in beef open lots. 2010*, 641-653.
- Larney, F. J., & Hao, X. (2007). A review of composting as a management alternative for beef cattle feedlot manure in southern Alberta, Canada. *Bioresource Technology*, 98(17), 3221-3227. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.07.005>
- Luebke, M. K., Erickson, G. E., Klopfenstein, T. J., & Greenquist, M. A. (2012). Nutrient mass balance and performance of feedlot cattle fed corn wet distillers grains plus solubles. *Journal of Animal Science*, 90(1), 296-306. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2414>
- National Research Council. (2000). Nutrient Requirements of Beef Cattle: Seventh Revised Edition: Update 2000. In *Nutrient Requirements of Beef Cattle* (Vol. 2000). <https://doi.org/10.17226/9791>
- Rout, P. K., & Behera, B. K. (2021). Sustainability in Ruminant Livestock: Management and Marketing. In *Sustainability in Ruminant Livestock: Management and Marketing*. <https://doi.org/10.1007/978-981-33-4343-6>
- Vaneekhaute, C., Ghekiere, G., Michels, E., Vanrolleghem, P. A., Tack, F. M. G., & Meers, E. (2014). Assessing Nutrient Use Efficiency and Environmental Pressure of Macronutrients in Biobased Mineral Fertilizers: A Review of Recent Advances and Best Practices at Field Scale. *Advances in Agronomy*, 128, 137-180. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802139-2.00004-4>

CAPÍTULO 7

SEROPREVALENCIA A *Mycobacterium avium* SUBESPECIE *paratuberculosis* POR RAZAS EN OVINOS EN TRES UNIDADES DE PRODUCCIÓN¹

Data de submissão: 20/06/2024

Data de aceite: 02/07/2024

José Vicente Velázquez-Morales

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Departamento de Biología de la
Reproducción, División de

Ciencias Biológicas y de la Salud

Ciudad de México, México. C.P. 09340

Instituto Mexicano del Seguro Social

OOAD, HGZ 57, Edo de Méx. Ote, México

<https://orcid.org/0000-0003-2576-670X>

Marco Antonio Santillán-Flores

Instituto Nacional de Investigaciones

Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)

Centro Nacional de Investigación

Disciplinaria en Microbiología Animal

Colonia Palo Alto, Alcaldía Cuajimalpa

México. C.P. 05110

<https://orcid.org/0000-0001-7423-8642>

Dionicio Córdova-López

Instituto Nacional de Investigaciones

Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)

Centro Nacional de Investigación

Disciplinaria en Microbiología Animal

Colonia Palo Alto, Alcaldía Cuajimalpa

México. C.P. 05110

<https://orcid.org/0009-0007-8035-4376>

Juan Salazar-Ortiz

Colegio de Postgraduados

Campus Córdoba

Posgrado de Innovación

Agroalimentaria Sustentable

Municipio de Amatlán de los Reyes

Veracruz, México. C.P. 94946

<https://orcid.org/0000-0002-0435-8160>

Ramón Soriano-Robles

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

Departamento de Biología

de la Reproducción

División de Ciencias

Biológicas y de la Salud

Ciudad de México

México. C.P. 09340

<https://orcid.org/0000-0002-3630-9910>

Edgar Valencia-Franco

Benemérita Universidad

Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Agrícolas

y Pecuarias

Tlatlauquitepec, Puebla

México. C. P. 72501

<https://orcid.org/0000-0002-3582-4769>

José Luis Ponce-Covarrubias

Universidad Autónoma de Guerrero

Escuela Superior de Medicina

Veterinaria y Zootecnia No. 3

Técpan de Galeana, Guerrero

México. C.P. 40900

<https://orcid.org/0000-0002-0182-6846>

¹ Fuente financiadora del presente proyecto; RECURSOS FISCALES INIFAP SIGI 16593034896-P, parte de la información son resultados parciales de la Estancia Posdoctoral por México (CONAHCYT) del Dr. en C. José Vicente Velázquez Morales.

RESUMEN: El objetivo fue estimar la seroprevalencia por raza en ovinos a *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en tres unidades de producción. Uno de los principales problemas de la paratuberculosis es el realizar un diagnóstico acertado para identificar a los animales en etapa subclínica que excretan al agente causal. Los programas de detección de animales infectados a paratuberculosis han utilizado pruebas serológicas, para descubrir la presencia de anticuerpos contra el agente causal, las pruebas incluyen la técnica de inmunodifusión en gel de agar (AGID) y la prueba de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se desarrolló un estudio epidemiológico transversal, en tres unidades de producción (UPP) de ovinos en México, ubicadas en los siguientes municipios: Córdoba-Veracruz (UPP1), Tepeyehualco-Puebla (UPP2) y en Tlatlauquitepec-Puebla (UPP3). Se realizó muestreo no probabilístico, por conveniencia, con ovinos mayores a seis meses que no presentaran signos clínicos de PTB. Se aplicó una cedula de datos por ovino y por unidad de producción, el diagnóstico serológico se realizó con la prueba ELISA anti-MAP, el análisis estadístico fue un análisis en cuadros de 2 x n con la variable de diagnóstico (positivo/negativo). Los resultados de la seroprevalencia en la población total fue del 21.1%, las tres unidades de producción presentaron al menos un animal seropositivo a paratuberculosis. La seroprevalencia en la UPP1 fue del 21.3 %, en la UPP2 16% y en la UPP3 29.5 %. Conclusiones: no hubo diferencia estadística en la seroprevalencia por raza en ovinos a *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en tres unidades de producción de ovinos, si hubo mayor seroprevalencia para los ovinos de la raza Texel, sin embargo, se recomienda realizar un estudio con un mayor número observaciones de los ovinos de esta raza.

PALABRAS CLAVE: ELISA anti-Map. Paratuberculosis ovina. Raza.

SEROPREVALENCE OF *Mycobacterium avium* SUBSPECIES *paratuberculosis* BY BREED IN SHEEP IN THREE PRODUCTION UNITS

ABSTRACT: The objective was to estimate the seroprevalence by breed in sheep of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in three production units. One of the main problems with paratuberculosis is making an accurate diagnosis to identify animals in the subclinical stage that excrete the causal agent. Detection programs for animals infected with paratuberculosis have used serological tests to detect the presence of antibodies against the causative agent. The tests include the agar gel immunodiffusion (AGID) technique and the enzyme-linked immunosorbent assay test (ELISA). A cross-sectional epidemiological study was developed in three sheep production units (UPP) in Mexico, located in the following municipalities: Córdoba-Veracruz (UPP1), Tepeyehualco-Puebla (UPP2) and in Tlatlauquitepec-Puebla (UPP3). Non-probabilistic sampling was carried out, for convenience, with sheep older than six months that did not present clinical signs of PTB. A data sheet was applied per sheep and per production unit, the serological diagnosis was carried out with the anti-MAP ELISA test, the statistical analysis was an analysis in 2 x n tables with the diagnostic variable (positive/negative). The results of the seroprevalence in the total population were 21.1%, the three production units had at least one animal seropositive for paratuberculosis. The seroprevalence in UPP1 was 21.3%, in UPP2 16% and in UPP3 29.5%. Conclusions: There was no statistical difference in the seroprevalence by breed in sheep to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

in three sheep production units, there was a higher seroprevalence for sheep of the Texel breed, however, it is recommended to carry out a study with a larger number observations of sheep of this breed.

KEYWORDS: ELISA anti-Map. Ovine paratuberculosis. Breed.

1 INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), está presente en muchos países y se percibe como una enfermedad importante porque impacta en; la economía, la salud animal, en bienestar animal y en la salud pública. La PTB tiene distribución mundial y su prevalencia va del 5 al 25 % (Martínez-Covarrubias et al., 2012). En Francia la prevalencia entre el ganado es del 20% (Saxmose & Toft, 2009). Stau et al. (2012) reportaron seroprevalencia en ovejas (65%) y en cabras (71%) y en Alemania reportaron que el 65% los hatos tenía al menos un animal positivo. La prevalencia en México se estima entre el 5 y el 30 % (Guzmán-Ruiz et al., 2016). En pequeños rumiantes, se han utilizado diferentes pruebas serológicas, para detectar la presencia de anticuerpos contra MAP, las pruebas incluyen la inmunodifusión en gel de agar (AGID) y la prueba de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), esta prueba diagnóstica posee varias ventajas como: es de bajo costo, la colecta de muestra es fácil y posee bajo riesgo de contaminación (Stau et al., 2012). El aplicar pruebas diagnósticas es de importancia ya que son la base de los programas de control y vigilancia de PTB, estos programas están basados en la detección oportuna de los focos de infección (Jaimes et al. 2008). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue, estimar la seroprevalencia por raza en ovinos a *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en tres unidades de producción.

2 MATERIAL Y MÉTODOS

Se desarrolló un estudio epidemiológico de tipo transversal realizando un muestreo en tres unidades de producción (UPP) de ovinos ubicadas en los municipios de: Córdoba-Veracruz (UPP1), Tepeyehualco-Puebla (UPP2) y en Tlatlauquitepec- Puebla (UPP3). Se trabajó con productores cooperantes por muestreo no probabilístico, por conveniencia. Los criterios de inclusión para la selección de los ovinos fueron: animales mayores a seis meses y aparentemente sanos. En la UPP1 se muestrearon 108 ovinos, en la UPP2 se muestrearon 75 y en la UPP3 71, en total fueron 254 ovinos. Se aplicó una cedula de datos por ovino para capturar la información por unidad de producción, raza (Pelibuey, Dorper, Texel, East Friesian y Katahdin) y sexo.

2.1 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Para realizar el diagnóstico serológico, se realizó toma de muestra de sangre, vía punción yugular con tubo vacutainer sin anticoagulante, posteriormente se centrifugaron (1000 x g durante 10 min) para recuperar el suero en tubos estériles de 2 ml, las muestras se conservaron en congelación (-20° C), hasta su procesamiento para realizar ELISA anti-MAP, esta técnica detecta anticuerpos Anti-MAP, según el protocolo de Martínez-Covarrubias et al. (2012) el cual tiene punto de corte a 0.22 densidades ópticas.

2.2 ANÁLISIS DE DATOS

Con los resultados de la prueba de ELISA anti-Map y con la información obtenida de las cédulas, se generó una base de datos para el análisis estadístico, el cual consto de un análisis en cuadros de 2 x n con la variable de diagnóstico (positivo/negativo), para el análisis comparativo entre las variables y prueba diagnóstica. El análisis estadístico se realizó con el programa STATA 7.0 (StataCorp LP, College Station, TX, USA).

3 RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados de la prueba ELISA indican que, del total de 254 ovinos, 56 fueron serológicamente positivos a MAP. Por lo que, la seroprevalencia en la población total fue del 21.1%, con esto se determinó que las tres unidades de producción presentaron al menos un animal seropositivo a paratuberculosis. La seroprevalencia en la UPP1 ubicada en el estado de Veracruz fue del 21.3 %, la cual es mayor a lo reportado por Méndez Olvera et al. (2013) que indicaron un 13% de prevalencia, en el mismo estado, respecto a las UPP ubicadas en Puebla, la UPP2 y UPP3, obtuvieron seroprevalencia del 16 % y 29.5 % respectivamente, estos valores fueron menores a lo reportado por Gallaga-Maldonado et al. (2017) quienes reportaron prevalencia del 48.1 % en el mismo estado. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre las tres unidades de producción ($p=0.137$) (Cuadro 1). En este estudio los valores de seroprevalencia total entra en el rango reportado a nivel mundial, el cual es del 5 al 25% (Martínez-Covarrubias et al., 2012).

Cuadro 1. Seroprevalencia de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en tres unidades de producción de ovinos.

UPP	Positivos	Negativos	Total	Valor de p
1	21.3 % (23/108)	78.7% 85/108	100% 108/108	
2	16% (12/75)	84% 63/75	100% 75/75	0.137
3	29.5 (21/71)	70.5% 50/71	100% 71/71	

Nivel de significancia $P=0.05$.

En relación a la seroprevalencia por raza, los animales de raza Texel presentaron mayor frecuencia a positivos con un 50%, como lo indica el Cuadro 2, se ha reportado mayor número de animales seropositivos en los ovinos de la raza Rambouillet en comparación con ovinos de genotipo local (criollos) o cruzas; esto podría estar relacionado con la susceptibilidad resistencia de la infección entre razas. Lo cual podría deberse a la adaptación, o bien que los ovinos de raza pura están infectados y al ser introducidos al rebaño, se disemina la enfermedad (Morón-Cedillo et al., 2015).

Cuadro 2. Seroprevalencia a paratuberculosis por raza en ovinos.

Raza	(n)	Positivos a ELISA	Seropositivos (%)	Valor de p
Pelibuey	65/254	10/65	15.3	
Dorper	47/254	13/47	27.6	
Texel	6/254	03/06	50	0.031
East Friesian	75/254	12/75	16	
Katahdin	54/254	18/54	23	

Nivel de significancia P=0.05.

4 CONCLUSIONES

No hubo diferencia estadística en la seroprevalencia por UPP, la raza Texel presento mayor porcentaje en animales seropositivos, sin embargo, esta deducción podría deberse al reducido número de ovinos de esta raza.

LITERATURA CITADA

Gallaga Maldonado, É. P., Arellano Reynoso, B., Antonio, M., Flores, S., Del Carmen, L., Humara, F., Córdova López, D., Morales, R. J., & Aparicio, E. D. (2017). Epidemiological situation of paratuberculosis in mainly goat regions of Puebla, Mexico. *Quehacer Científico En Chiapas*, 12(1), 2017. https://www.dgip.unach.mx/images/pdf-REVISTA-QUEHACERCIENTIFICO/2017-ener-jun/4.Situacion_epidemiologica_de_la_paratuberculosis.pdf

Guzmán-Ruiz, C. C., Santillán-Flores, M. A., & Córdova-López, D. (2016). Prevalence and possible risk factors for caprine paratuberculosis in intensive dairy production units in Guanajuato, México. *Veterinary Medicine and Animal Health*, 8(11), 156–162. <https://doi.org/10.5897/JVMAH2016.0497>

Martínez-Covarrubias, G. A., Flores, S., Antonio, M., Ruiz, G., Humara, F., Carmen, L., López, C., Aparicio, D., Ochoa, B., Ángel, M., Guadalupe, A., Covarrubias, M., Antonio, M., Flores, S., & Celic, C. (2012). Desarrollo de un inmuno-ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*.

Méndez Olvera, T. E., Ramírez Lorenzo, N. I., Rojas Serranía, N., Olivares Orozco, L. J., & Martínez Gómez, D. (2013). Detección de Mycobacterium avium paratuberculosis en caprinos ubicados en una zona semi-árida en el municipio de Tecozautla Hidalgo. *Rev. Salud Anim.*, 35(3), 182–188.

Morón-Cedillo, F. J., Cortez-Romero, C., Santillán-Flores, M. A., Figueroa-Sandoval, B., & Gallegos-Sánchez, J. (2015). Prácticas de manejo asociadas con la seroepidemiología de paratuberculosis ovina en San Luis Potosí. *Management Practices Associated To the Seroepidemiology of Sheep Paratuberculosis in San Luis Potosí*, 8(6), 30–37. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fap&AN=112195993&site=ehost-live>

Saxmose, S., & Toft, N. (2009). *A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe*. 88, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.07.003>

Stau, A., Seelig, B., Walter, D., Schroeder, C., & Ganter, M. (2012). Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in small ruminants in Germany. *Small Ruminant Research*, 105(1–3), 361–365. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.03.008>

ALIMENTOS À BASE DE SEMENTES DE *Moringa oleifera*

Data de submissão: 20/06/2024

Data de aceite: 03/07/2024

Adèle Gautier

LEAF-Linking Landscape
Environment, Agriculture and Food
Instituto Superior de Agronomia
Universidade de Lisboa
Tapada da Ajuda
Lisbon, Portugal

Carla Margarida Duarte

LEAF-Linking Landscape
Environment, Agriculture and Food
Instituto Superior de Agronomia
Universidade de Lisboa
Tapada da Ajuda
Lisbon, Portugal
Egas Moniz Center for
Interdisciplinary Research (CiiEM)
Egas Moniz School of
Health and Science, 2829-511
Caparica, Almada, Portugal
<http://orcid.org/0000-0003-0699-5611>

Isabel de Sousa

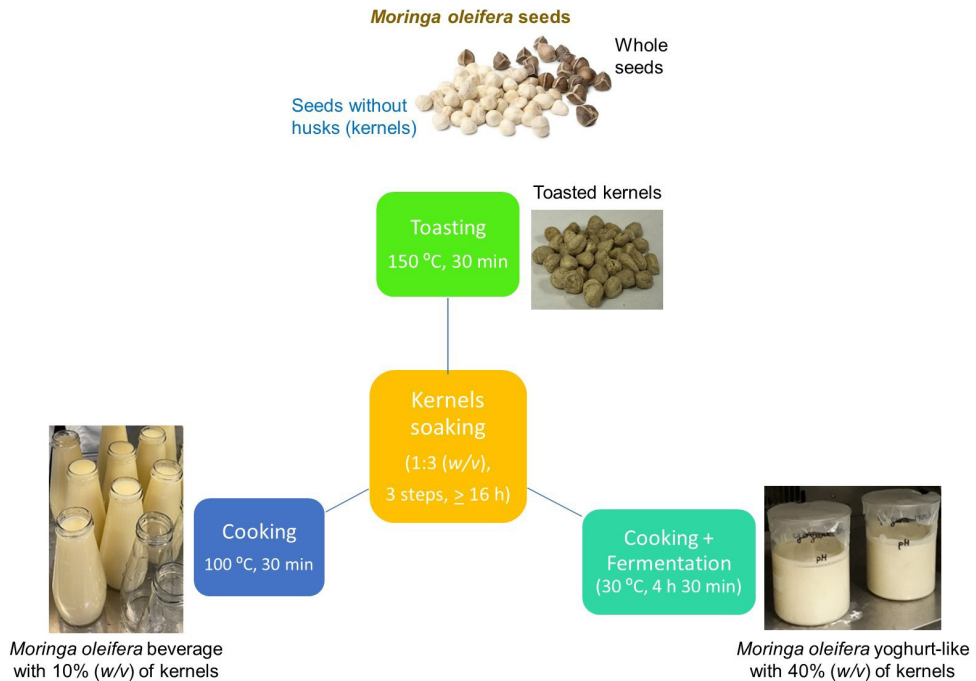
LEAF-Linking Landscape
Environment, Agriculture and Food
Instituto Superior de Agronomia
Universidade de Lisboa
Tapada da Ajuda
Lisbon, Portugal
<http://orcid.org/0000-0001-9384-7646>

RESUMO: A *Moringa oleifera* (MO) é uma árvore da família Moringaceae de crescimento rápido e resistente à seca, nativa do subcontinente indiano e usada extensivamente no sul e sudeste da Ásia. Existem no entanto, alguns problemas relativos ao amargor das sementes, tornando-as um obstáculo na aceitação pelo consumidor. Para se obter alimentos a partir das sementes de MO, foram realizadas várias técnicas de processamento, incluindo: (i) sementes de MO tostadas; (ii) bebidas feitas a partir de MO; e (iii) produtos semelhantes aos iogurtes, todos sendo posteriormente submetidos a análises físico-químicas e reológicas. A concentração proteica variou entre 3,68% na bebida, 14,73% no iogurte e 40,21% nas sementes tostadas de MO. A tostagem das sementes evidenciou ser uma boa opção e as alegações nutricionais correspondentes relativas ao teor em minerais podem ser consideradas para o Mg, P, Fe, Zn e Mn, confirmando a riqueza das sementes de *M. oleifera* em vários elementos. O produto à base de MO semelhante ao iogurte evidenciou ter um sabor muito agradável e uma estrutura gelificada semelhante ao iogurte lácteo, tornando-o uma nova alternativa vegetal promissora. No futuro, deve-se otimizar o processo de remoção do amargor das sementes cruas, de maneira a obter uma bebida à base de MO sensorialmente mais agradável.

PALAVRAS-CHAVE: Bebida de sementes de *Moringa oleifera*. Iogurte-tipo. Fermentação ácido-láctica. Reologia.

FOODS BASED ON *Moringa oleifera* SEEDS

VISUAL ABSTRACT:



KEYWORDS: *Moringa oleifera* seed beverage. Yoghurt-like. Lactic acid fermentation. Rheology.

1 INTRODUÇÃO

A *Moringa oleifera* (MO), também conhecida como a “árvore da vida” ou “árvore milagrosa”, é uma árvore pequena, nativa do norte da Índia e do Paquistão, que tem sido cultivada há muitos anos. Atualmente, está distribuída pelo mundo e tem sido naturalizada em muitos países de África (BOSCH, 2004). A moringa ganhou grande importância global por causa das suas múltiplas utilizações, boa adaptabilidade a vários solos e clima, e fácil disseminação. A denominação específica “oleifera” deve-se a um teor de 35-45% de gordura nas sementes (AYERZA, 2011).

A MO é considerada como uma das plantas mais ricas em nutrientes no mundo e tem sido conhecida pelos seus extensos benefícios medicinais. Em todo o continente africano, os componentes da planta são utilizados para uma variedade de usos agrícolas, médicos, dietéticos e fitoquímicos. Consequentemente, a moringa é considerada uma planta nutracêutica que pode ser usada em dietas diárias para melhorar as condições de

saúde das populações rurais em países em desenvolvimento. Na África Ocidental, uma série de projetos de saúde destinados a combater a desnutrição, têm sido bem sucedidos ao incentivar o uso de pó de folha de moringa na dieta de crianças, mulheres grávidas e lactantes (KUKU-SHITTU *et al.*, 2016). O pó de folhas de MO pode ser encontrado em qualquer supermercado em países ocidentais como um ingrediente funcional ou nutracêutico. Acredita-se que as substâncias bioativas benéficas encontradas nas folhas de *M. oleifera*, incluindo ácidos fenólicos, flavonóides, alcalóides, fitoesteróis, açúcares naturais, vitaminas, minerais e ácidos orgânicos, sejam responsáveis pelos benefícios terapêuticos tradicionais da planta (SAINI *et al.*, 2016; LIN *et al.*, 2018). As folhas de MO fornecem sete vezes mais vitamina C do que a laranja, dez vezes mais vitamina A do que a cenoura, dezessete vezes mais cálcio do que o leite, nove vezes mais proteína do que o iogurte, quinze vezes mais potássio do que a banana e vinte e cinco vezes mais do que o espinafre (ROCKWOOD *et al.*, 2013). Daí que a biofortificação mineral, que aborda uma das maiores lacunas alimentares nas dietas africanas, seja extremamente suficiente por esta via. Os asiáticos têm usado as folhas de MO como uma fonte alimentar nutritiva por milénios, sendo a cozinhada a aplicação mais difundida. Nos últimos anos, uma nova indústria surgiu nos países industrializados, em resultado dos diferentes usos dietéticos do pó da folha (como pão, iogurte e biscoitos). Devido a esta aplicação comercial rentável da moringa, as sementes têm sido negligenciadas.

As sementes de MO são uma alternativa promissora para a suplementação alimentar evidenciada em alguns trabalhos já disponíveis: o uso da farinha de sementes de MO como fortificante da farinha de trigo na produção de pães, biscoitos e biscoitos (OYEYINKA & OYEYINKA, 2018), e também o extracto da semente como agente espessante na produção de iogurte lácteo (QUINTANILHA *et al.*, 2021) melhoram as qualidades nutricionais e o comportamento reológico dos alimentos. Vários estudos *in vitro* também demonstraram que a semente de MO possui atividades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, potencial antimicrobiano e anticancerígeno, bem como atividade antioxidante (BRILHANTE *et al.*, 2017; GUPTA *et al.*, 2018).

Na Guiné-Bissau, as sementes de MO são utilizadas para regular a pressão arterial e tratar a asma (BANCESSI *et al.*, 2020), mas em África, também são usadas para tratar diabetes, febre, malária e disfunção sexual (AGOYI *et al.*, 2017). A composição das sementes de MO apresenta maiores teores de proteína (36%), gordura (38,7%), vitamina E (752 mg por 100 g de semente seca), magnésio (635 mg por 100 g de semente seca) e cobre (5,2 mg por 100 g de semente seca), quando comparada às folhas e vagens de MO (GOPALAKRISHNAN *et al.*, 2016). As sementes de MO fritas são consumidas na Nigéria e dizem ter um sabor semelhante ao do amendoim. As sementes são geralmente

adicionadas aos molhos para lhes conferir o seu sabor amargo. Pesquisas mostram que o óleo da semente de MO contém cerca de 76% de MUFA, sendo o ácido oleico, o predominante e responsável por 73% do teor total em ácidos gordos (LEONE et al., 2016; ÖZCAN, 2018; GHARSALLAH et al., 2021), possuindo a capacidade de controlar o nível de colesterol, tornando-o o ideal substituto do azeite (LALAS & TSAKNIS, 2002) e conferindo-lhe a sua alta estabilidade oxidativa. O processo de extração deste óleo é uma atividade promissora, uma vez que o seu uso é bem-vindo em cosmética como veículo neutro para fragrâncias, sabonetes e como lubrificante adequado para equipamento utilizado em fabrico de alimentos, e apresenta um preço de mercado crescente.

A maioria das plantas perde as suas propriedades antinutricionais quando são processadas. As sementes de MO contêm alguns péptidos amargos com alguma atividade hemaglutinante, glucosinolatos (65,5 $\mu\text{mol/g}$ de sementes, o que equivale a aproximadamente 40 mg/g ou 4% do peso da semente) (BENNETT et al., 2003) e fitatos. Todos os glucosinolatos são compostos fortemente amargos. Podem ser extraídos com misturas de água e álcool devido à sua solubilidade em água, e são susceptíveis de ser destruídos pelo calor (BARTHET & DAUN, 2011). Os fitatos estão presentes numa extensão de 1% a 6% e podem reduzir a biodisponibilidade mineral em animais monogástricos, particularmente Zn^{2+} e Ca^{2+} (FERREIRA et al., 2008). A presença de fitato e outros antinutrientes podem reduzir a biodisponibilidade de certos nutrientes, mas a fermentação pode ser utilizada para neutralizar esse efeito e potencializar a utilização máxima dos nutrientes necessários das sementes. Quando comparado o conteúdo nutritivo das farinhas de sementes de MO cruas, germinadas e fermentadas, verificou-se que o teor em fitoquímicos era maior na farinha de sementes cruas e o conteúdo em aminoácidos atingiu o seu pico nas farinhas de sementes fermentadas e germinadas (MISHRA et al., 2012; IJAROTIMI et al., 2013). Estes valores podem ser o resultado das alterações bioquímicas que ocorrem durante a fermentação, incluindo o aumento do teor em proteínas, aminoácidos essenciais e dos perfis de ácidos gordos poli-insaturados, além de reduzir a composição de antinutrientes provenientes das sementes de MO, sendo mais eficiente do que as técnicas de processamento por germinação (IJAROTIMI et al., 2013). Assim, a semente de MO pode apresentar excelentes propriedades nutricionais com baixa toxicidade após um processamento eficiente, fornecendo uma boa alternativa a algumas sementes de leguminosas (pobres em aminoácidos ricos em enxofre) como fonte de proteínas, óleos e compostos antioxidantes de alta qualidade (FERREIRA et al., 2008).

Este trabalho teve início com a caracterização físico-química das sementes de MO para avaliar a sua potencial utilização como alimento. Diferentes técnicas de

processamento, tais como a demolha, a tostagem, a cozedura e a fermentação, foram testadas e discutidas durante o desenvolvimento de alimentos à base de sementes de MO, para se obter boas características sensoriais e remover o sabor amargo. O comportamento do fluido quanto à viscosidade do 1) iogurte-tipo de MO desenvolvido foi estudado e comparado com o iogurte comercial de soja e o iogurte lácteo com baixo teor de gordura, e o da 2) bebida à base de MO foi comparada com bebidas à base de grão-de-bico e tremoço desenvolvidas num estudo anterior (LOPES *et al.*, 2020).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Diferentes técnicas de processamento foram testadas para o desenvolvimento de alimentos à base de sementes de *Moringa oleifera* para se obter boas características sensoriais e se remover o sabor amargo: demolha, cozedura, tostagem em diferentes tempos e temperaturas, e também a utilização da fermentação ácido-láctica. Por fim, foram seleccionados três diferentes processos e alimentos resultantes de acordo com a revisão bibliográfica, tendo em conta a obtenção de uma boa qualidade sensorial: sementes tostadas de *M. oleifera*, bebida à base de MO e um tipo de iogurte à base de MO.

2.1 PREPARAÇÃO DE SEMENTES DE *M. oleifera* TOSTADAS

As sementes descascadas de *Moringa oleifera* (amêndoas) foram adquiridas num fornecedor indiano (Ramamoorthy Exports).

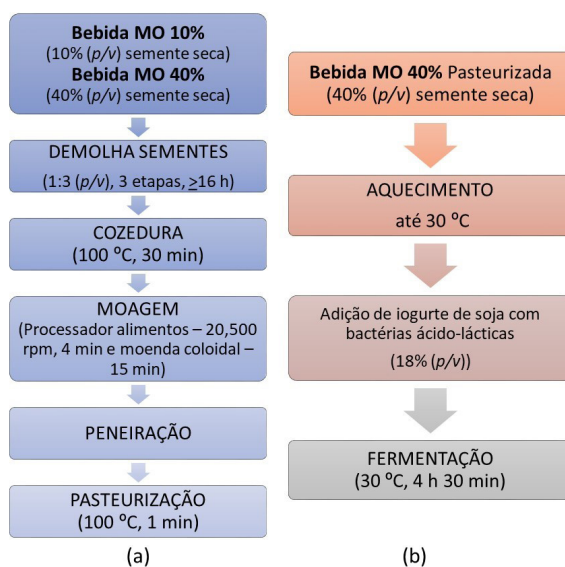
A produção das sementes tostadas evoluiu para a seguinte otimização final: 20 g de sementes secas foram demolhadas duas vezes em água morna da torneira (30–35 °C) e uma vez em água fria da torneira (15–20 °C) na proporção de 1:3 (p/v) por cerca de 16 h (PAN & TANGRATANAVALEE, 2003). Todas as águas de demolha foram descartadas. Posteriormente, as sementes demolhadas foram tostadas em estufa de ar forçado a 150 °C por 30 min. As sementes de MO cruas e tostadas foram armazenadas à temperatura ambiente para posterior análise.

2.2 PREPARAÇÃO DA BEBIDA À BASE DE SEMENTES DE *M. oleifera*

Para a produção de bebidas à base de MO e do iogurte-tipo foram utilizadas duas diferentes concentrações de sementes: 10% e 40% (p/v) do total de sementes secas, respectivamente. As sementes foram demolhadas conforme descrito anteriormente, cozidas em água a ferver por 30 min numa panela de pressão (KHANDELWAL *et al.*, 2010) e as águas descartadas. As sementes cozidas foram escoadas, e o volume correspondente de água da torneira foi adicionado para cumprir com as proporções de 10% ou 40%

(p/v) de sementes secas em água. Em seguida, a mistura foi moída num processador de alimentos (Bimby-Worwerk, Wuppertal, Alemanha) a 20.500 rpm durante 4 min com apenas 250 mL de água da torneira (adaptado de trabalhos anteriores (NELSON *et al.*, 1976; SETHI *et al.*, 2016), seguida de uma moagem fina realizada num moinho coloidal (Pulverisette 2, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Alemanha) à escala laboratorial, a 70 rpm, durante 15 min utilizando o volume de água restante. A bebida resultante foi peneirada com um filtro antes de ser acondicionada em frascos esterilizados. Na etapa de pasteurização, adaptada de trabalho anterior (NELSON *et al.*, 1976), os frascos cheios e capsulados (temperatura da bebida superior ou igual a 90 °C), foram submetidos a choque térmico, no interior de uma panela de pressão, durante 1 min, em água a ferver (Figura 1a).

Figura 1. Etapas do procedimento de fabrico (a) da bebida à base de sementes de *M. oleifera* e (b) do iogurte-tipo à base de sementes de *M. oleifera*.



Após a produção, as duas concentrações da bebida de MO foram conservadas a 4 °C, num máximo de 7 dias para posterior análise ou fermentação.

2.3 PREPARAÇÃO DO IOGURTE-TIPO À BASE DE SEMENTES DE *M. oleifera*

Um iogurte comercial de soja (Alpro natural 125 g, Danone, Portugal) contendo as culturas lácticas (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) foi adicionado na proporção de 18% (p/v) ao volume correspondente de bebida refrigerada à base de MO com 40% (p/v) de sementes secas, para posterior fermentação láctica (Figura 1b). A preparação foi então homogeneizada completamente durante a fase de aquecimento e incubada a 30–32 °C

durante 4 h e 30 min. Após a fermentação, os iogurtes-tipo de MO foram armazenados a 4 °C até 7 dias para análises físico-químicas.

2.4 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

A determinação da actividade de água (a_w) em farinhas de sementes cruas e tostadas de *M. oleifera* foi realizada em triplicados num equipamento Hygrolab (Rotronic, Hauppauge, NY, USA) a 20 ± 1 °C.

A determinação do teor em Proteína Total nas sementes cruas de MO foi realizada num Dumas Nitrogen Analyser NDA 702 (Velp Scientifica, Usmate, Itália) e o fator de correção utilizado para converter o azoto em proteína bruta foi de 6,25 (IJAROTIMI *et al.*, 2013). Todas as análises foram realizadas em triplicado e expressas em percentagem.

A análise do teor em Gordura Bruta nas sementes e no iogurte-tipo de MO baseou-se no método de extração de Soxhlet e foi realizada em triplicados de acordo com o método de Ijarotimi e colaboradores (IJAROTIMI *et al.*, 2013) com algumas modificações: 1 g de amostra foi pesada num cartucho de celulose e coberto com algodão absorvente, enquanto cerca de 50 mL de éter de petróleo (100 °C) (ref 32299-2500, Honeywell, Charlotte, NC, EUA) foi adicionado num copo pré-pesado. Tanto o cartucho como o copo foram acoplados à Unidade de Extração (TecatorSoxtec, Modelo 2043, Hilleroed, Dinamarca). Os lípidos solúveis das amostras foram extraídos no solvente por 15 min e enxaguados durante 1 h e 30 min. O solvente destilado foi então condensado e recolhido. Posteriormente, uma etapa final de secagem (105 °C durante 7 h) evaporou os últimos vestígios de solvente dos copos de extração. Os copos de extração secos foram pesados e a percentagem em massa de lípidos foi calculada de acordo com a Equação (1):

$$\text{Gordura Bruta (\%)} = \frac{\text{peso inicial copo extração} - \text{peso final copo extração}}{\text{peso da amostra}} \times 100 \quad (1)$$

O teor de gordura total na bebida de MO foi estimado pelo método de Gerber (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2008). Resumidamente, foi utilizado um butirómetro onde se realizou a hidrólise ácida para digerir os triplicados das amostras proteicas com ácido sulfúrico (ref 1082-00, Weber Scientific, Hamilton, NJ, EUA) e álcool amílico (ref 1087-00, Weber Scientific, Hamilton, NJ, EUA), em banho-maria durante 5 min a 65 ± 2 °C, seguido de separação da gordura por centrifugação (1100 rpm durante 4 min). O valor do teor em gordura foi lido directamente na escala do butirómetro como uma percentagem de massa do conteúdo de gordura na amostra.

A acidez total existente na bebida e no iogurte-tipo de MO foi determinada em triplicados de acordo com o método internacional OIV-MA-AS313-01:R2015 adaptado

(INTERNATIONAL ORGANIZATION OF VINE AND WINE, 2019), com algumas modificações. Resumidamente, cada amostra (20 mL) foi diluída em 25 mL de água fervida. Em seguida, foram adicionadas 3 gotas de fenolftaleína para a titulação com NaOH 0,1 N (aq.) (ref 221465, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Alemanha). A acidez total foi expressa em miliequivalentes (mEq) de ácido/L.

A matéria seca das sementes de MO cruas e tostadas, da bebida e do iogurte foi determinada gravimetricamente por secagem a 105 ± 5 °C em estufa de ar forçado (Binder, FED 115, Tuttlingen, Alemanha) até peso constante da amostra, sendo o seu resíduo sólido calculado em percentagem. A percentagem de humidade em triplicados foi calculada de acordo com a Equação (2):

$$\text{Humidade (\%)} = \left[100 - \frac{P3 - P1}{P2 - P1} \right] \times 100 \quad (2)$$

em que o P1 é o peso do cadinho, P2 é o peso do cadinho e da amostra antes da secagem a 110 °C e P3 é o peso do cadinho com o resíduo da amostra após secagem e arrefecimento em excicadores herméticos.

O teor de cinzas foi determinado gravimetricamente por incineração a 550 ± 10 °C numa mufla (Snol 164 LHM01, Utena, Lituânia) para a bebida de *M. oleífera*, e para o iogurte-tipo de MO a determinação foi efectuada de acordo com o método AOAC 923.03 (2005). Os resultados dos triplicados foram expressos em percentagem.

O teor em Hidratos de Carbono foi estimado por diferença para 100% dos constituintes principais (humidade, cinzas, proteína e gordura). Os valores energéticos da bebida e do iogurte-tipo de MO foram calculados considerando os factores de conversão (Regulation (EC) No 1169/2011) para proteína (4 kcal/g; 17 kJ/g), gordura (9 kcal/g; 37 kJ/g) e hidratos de carbono (4 kcal/g; 17 kJ/g).

Os teores em minerais nas sementes, bebidas e iogurtes-tipo de MO foram obtidos em triplicados por espectrometria de emissão óptica (ICP-OES: iCAP 7000 Series Spectrometer equipped with ASX-520 AutoSampler, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Resumidamente, 0,25–0,30 g de farinha de semente, 5–6 g de iogurte-tipo de MO e 5 mL de bebida de MO foram transferidos para os recipientes de digestão e os respectivos volumes de HCl (37%) (ref 30721, Fluka, Honeywell, Charlotte, NC, EUA) e de HNO₃ (65%) (ref 695041, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Alemanha) foram adicionados numa proporção de 3:1. A digestão (SCP Science, DigiPREP MS, Baie d'Urfe, QC, Canadá) ocorreu a 15 min/45 °C, 15 min/80 °C e 60 min/105 °C. Após o arrefecimento, adicionou-se água destilada até 50 mL e a solução

foi deixada a decantar. Finalmente, o sobrenadante límpido foi utilizado na análise ICP. Onze elementos (Na, K, Ca, Mg, P, S, Fe, Zn, Mn, B) foram determinados em triplicado. Os resultados foram expressos em mg por elemento mineral por 100 g de amostra (matéria seca para sementes tostadas e peso para iogurte), exceto para bebidas (mg/100 mL).

A cor da bebida de *M. oleifera* e do iogurte-tipo de MO foi medida com um colorímetro Minolta CR-300 (Tóquio, Japão), calibrado com uma placa de porcelana padrão branca (L^* 96,96; a^* 0,37; b^* 2,10). Os resultados foram expressos de acordo com o sistema de cores uniforme CIELAB com referência ao padrão de iluminação D65 (condições médias de luz do dia) e um ângulo visual de 2°. Os parâmetros de cor determinados foram L^* , que explica a luminosidade (i.e., 0% para preto e 100% para branco), a^* varia de verde para vermelho e b^* de azul para amarelo, o que corresponde a uma variação numérica de -60 a +60. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente sob condições de luz semelhantes (isto é, 50 mm² de área de medição por medida) e replicadas 6 vezes por amostra.

A diferença de cor total entre as amostras foi calculada de acordo com a Equação (3). O leite inteiro UHT de vaca e uma bebida de soja, mas também um iogurte de vaca comercial e um iogurte de soja foram utilizados como referências para a bebida de MO e iogurte-tipo de MO, respectivamente.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (3)$$

Considerando que se ΔE^* for superior a cinco unidades, a diferença de cor é detectável pelo olho humano (CASTELLAR et al., 2006).

Os valores de pH (medidor de pH Basic 20, CRISON Instruments, Barcelona, Espanha) da bebida e do iogurte-tipo de MO foram medidos à temperatura ambiente no dia após a produção respectiva.

2.5 AVALIAÇÃO SENSORIAL DAS AMOSTRAS

O desenvolvimento dos protótipos de alimentos à base de sementes de MO também incluiu uma avaliação concisa de suas características sensoriais, após cada nova condição da etapa de processamento (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 1994). Essa avaliação foi realizada pelos autores e outras pessoas do laboratório (amostra não representativa), para estimar a percepção do consumidor sobre cada protótipo e apoiar a decisão para a próxima etapa de processamento.

2.6 MEDIÇÕES REOLÓGICAS

A medição da variação da viscosidade com a velocidade de deformação na bebida e no iogurte-tipo à base de sementes de *M. oleífera*, no iogurte comercial de soja e no iogurte lácteo com baixo teor de gordura (Mimosa magro 125 g, Lactogal, Portugal) foram realizadas num reómetro (*controlled-stress rheometer*) (Thermo Fisher Scientific, Haake MARS III, Karlsruhe, Alemanha), com o uso de um cilindro concêntrico CCB/CC25 DIN Ti para evitar a separação de fases na bebida, e utilizando um sistema de placa inferior TMP60 (222-1891) e de um cone DC60/2° Ti (222-1932) para as medições no iogurte. Os ensaios nos iogurtes foram realizados a 20 ± 1 °C e a 8 ± 1 °C, sendo esta última a temperatura a que geralmente são consumidos (TRINDADE *et al.*, 2001). Os ensaios na bebida foram realizados a 20 ± 1 °C. As medições da viscosidade à velocidade de deformação constante foram efectuadas com taxas de deformação entre $1,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^3$ s⁻¹. Os testes demoraram 21 min cada e foram realizados em triplicado nas amostras devidamente homogeneizadas de iogurte e de bebida. As curvas de escoamento foram ajustadas ao modelo de Carreau (Equação (4)), visto os iogurtes e a bebida serem fluidos não-Newtonianos e evidenciarem comportamento reofluidificante (i.e., a viscosidade diminui à medida que a taxa de deformação aumenta) (BARNES, 2000):

$$\eta = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{(1 + (K\dot{\gamma})^2)^{\frac{m}{2}}} \quad (4)$$

onde “ η_0 ” é a primeira viscosidade limite Newtoniana (taxa de deformação “zero”) (Pa·s); η_{∞} é a segunda viscosidade limite Newtoniana (taxa de deformação “infinita”) (Pa·s); “ $\dot{\gamma}$ ” é a taxa de deformação (s⁻¹); “K” é o tempo de relaxamento (s) e o recíproco, 1/K ($\dot{\gamma}^{\circ}$), está relacionado com a taxa de deformação crítica (i.e., taxa de deformação inicial para a reofluidificação); e “m” é a constante adimensional relacionada com a Lei de Potência e com a contabilização do desvio do comportamento newtoniano. Na análise dos resultados utilizou-se o software TRIOS (TA Instruments, v4.5.1).

Todos os testes reológicos foram repetidos pelo menos três vezes. As amostras de iogurte foram deixadas em repouso durante 300 s após serem colocadas no sistema medidor e cobertas com uma camada de óleo de parafina para evitar a perda de humidade.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Procedeu-se à análise de variância (one-way ANOVA) para avaliar as diferenças significativas entre amostras com um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Para

comparações múltiplas utilizou-se o teste Tukey HSD. O tratamento estatístico dos dados foi realizado no software SPSS Statistics (v.20, IBM SPSS Statistics, New York, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PROGRESSÃO NAS TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO UTILIZADAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTOS À BASE DE SEMENTES DE *Moringa oleifera*

A Tabela 1 descreve as principais etapas de produção testadas durante o desenvolvimento de alimentos à base de sementes de *Moringa oleifera* com o objectivo de alcançar boas características sensoriais e remover o sabor amargo da semente.

Tabela 1. Progresso das etapas de processamento de alimentos à base de sementes de *M. oleifera* (sementes tostadas, bebidas e iogurtes) para alcançar a optimização final.

Descrição da tarefa	Resultados/ Avaliação sensorial	Próximos passos	Base da decisão
Tostagem das sementes			
65 °C durante 30 min	Ainda amarga, mas menos do que a semente crua; doce após mastigar.	Aumentar a temperatura para diminuir ou eliminar o amargor.	O controlo da temperatura ajudará a remover o amargor.
200 °C durante 1 h 40 min + 260 °C durante 16 min	Muito torrado, muito mau gosto (queimado).	Reduzir o tempo da tostagem.	
200 °C durante 30 min	Semente sem alteração de cor; ainda amarga e doce.	Reduzir a temperatura da tostagem.	
150 °C durante 30 min	Doce demais, amargo demais, não queimado.	Demolhar as sementes primeiro.	
Após demolha: 100 °C, durante 30 min	Sabor igual ao cru, ainda muito doce e amargo demais.	Manter a demolha e aumentar a temperatura para 150 °C.	
Após demolha: 150 °C, durante 30 min	Muito crocante, bom gosto (semelhante ao amendoim torrado).	Não é necessário.	OK. Melhor desempenho de processamento (MDP).
Demolha das sementes			
Demolha das sementes cruas (1:3 p/v). 3 etapas: primeiras duas com água morna (30–35 °C), última com água fria (15–20 °C) totalizando 16 horas.	Sabor igual às sementes cruas, ainda muito amargas e doces demais.	Cozer as sementes.	A demolha e a cozedura ajudam a libertar para a água os anti-nutrientes, nomeadamente, os compostos amargos.

Descrição da tarefa	Resultados/ Avaliação sensorial	Próximos passos	Base da decisão
Antes da cozedura: Sementes demolhadas cozidas em água da torneira quente (30 min, 100 °C)	Perdeu-se a doçura, mas ainda se sente um pouco do amargo.	Adição de sabores para melhorar o sabor da bebida.	OK. Testagem sensorial com novos sabores.
Moagem das sementes demolhadas			
Antes da cozedura: Processador de alimentos (4 min, 20,500 rpm) seguido de moenda no Ultraturrax (1 min, 20,500 rpm) + adição de água da torneira para ajudar na eficiência da moagem e na homogeneização da bebida.	Sabor amargo/cru muito forte. Sensação arenosa na boca.	Cozer as sementes demolhadas. Para reduzir a sensação arenosa, usar o moinho coloidal.	
Após cozedura: Processador de alimentos (4 min, 20,500 rpm) seguido de moenda coloidal (70 rpm, 15 min) + adição de água da torneira para ajudar na eficiência da moagem e na homogeneização da bebida.	Sabor suave e agradável, com um leve amargor na bebida final.	Não é necessário.	OK. MDP.
Fermentação			
“creme” de MO – bebida de MO com 40% (p/v) de sementes, com adição de 18% (p/v) de iogurte de soja incubado a 30 °C durante 4 h 30 min	Sabor e cheiro agradáveis. Aparência de creme líquido como a bebida.	Não é necessário.	OK. MDP.
Tempo de incubação de 21 h	Cheiro não tão agradável como o anterior: cheiro “a verde”; sem doçura. Separação de fases, apresentando camadas com ar no meio.		

3.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DOS ALIMENTOS OPTIMIZADOS À BASE DE SEMENTES DE *M. oleifera*

As sementes cruas e tostadas de *M. oleifera* não apresentaram diferenças significativas na análise físico-química (Tabela 2), excepto no teor em proteína o qual se deve à perda significativa de humidade das sementes durante a tostagem (0,33%),

levando a um valor maior (40,21%). Os teores de gordura (37,2% (p/p)) e de proteína (36,8% (p/p)) obtidos nas sementes cruas foram semelhantes aos citados no trabalho de Gopalakrishnan (2016) (38,7% (p/p) e 36,0% (p/p), respectivamente) e dentro dos intervalos apresentados por Brilhante e colaboradores (BRILHANTE *et al.*, 2017) para ambos os parâmetros (gordura: 30,8–41,2%; proteína: 29,4–38,3%). A variação nestes parâmetros pode ser atribuída à região onde a MO foi plantada e às condições de crescimento da planta (BRILHANTE *et al.*, 2017).

A comparação entre os teores de gordura e de proteína da semente de MO tostada e do amendoim tostado mostrou que a primeira é nutricionalmente melhor. As sementes de MO tostadas apresentaram um menor teor em gordura (34,95% vs. 49,6%), mas um teor proteico maior (40,21% vs. 25,6%) (Tabela 2) quando comparadas com o amendoim tostado (PortFIR, 2022).

Tabela 2. Resultados da análise físico-química das sementes de *Moringa oleifera* cruas e tostadas. Os valores estão representados como a média \pm desvio padrão (n = 3). As letras diferentes nas amostras, por parâmetro, indicam diferenças significativas entre elas ($p < 0,05$).

	aw	Humidade (%)	Acidez Total (mEq de ácido/ L)	Gordura (% w/w)	Proteína (% w/w)
Sementes cruas de MO	0.56 \pm 0.00	4.74 \pm 0.05 ^a	3.70 \pm 0.29	37.24 \pm 0.83	36.82 \pm 0.20 ^a
Sementes tostadas de MO	0.48 \pm 0.03	0.33 \pm 0.05 ^b	3.50 \pm 0.00	34.95 \pm 1.34	40.21 \pm 0.18 ^b

As sementes de MO cruas e tostadas são relativamente secas (4,74 e 0,33%, respectivamente) e a sua atividade de água permite prever a estabilidade e a segurança das sementes em termos de crescimento microbiano. O menor valor de aw em que ocorre a maioria da degradação dos alimentos é de 0,90, embora algumas leveduras e bolores possam crescer acima dos 0,61 (FONTANA *et al.*, 2001). As aw das sementes cruas e tostadas (0,56 e 0,48, respectivamente) confirmam a boa capacidade de conservação de ambas (Tabela 2).

A semelhança entre a acidez total das sementes cruas e das sementes tostadas (3,7% and 3,5%) pode ser devida à presença de alguns compostos amargos das sementes de MO que não terão sido extraídos durante a etapa da demolha.

A bebida à base de *M. oleifera* evidenciou um alto teor em proteína (3,68% (p/v)) (Tabela 3) quando comparado com o leite de vaca (3,3–3,5%) e com as bebidas vegetais comerciais (<1%) (LOPES *et al.*, 2020), tornando-se uma boa alternativa vegetal à proteína láctea tal como a bebida à base de grão-de-bico (3,24% p/v) e a bebida à base de tremçoço (4,05% p/v) (DUARTE *et al.*, 2022).

Com o propósito de mitigar totalmente o ligeiro amargor da bebida de MO, poder-se-à incluir uma etapa de tostagem entre a cozedura das sementes e a moagem coloidal, na optimização futura do processo. No trabalho de Ogunsina (2011), o sabor amargo da farinha de MO utilizada no fabrico de pães e de biscoitos, foi removido com sucesso através do aquecimento dos grãos cozidos a 80 °C durante 8 h.

Tabela 3. Análise química centesimal da bebida (10% p/v) e do iogurte-tipo à base de *Moringa oleifera*. A percentagem dos respectivos parâmetros é por 100 mL para a bebida e para 100 g para o iogurte-tipo. Os valores estão representados como a média ± desvio padrão (n = 3). * com base no teor de proteína da semente crua.

	pH	Acidez Total (mEq ácido/L)	Gordura (%)	Humidade (%)	Cinzas (%)	Proteína* (%)	Hidratos C. estim. (%)	Energia (kcal) (kJ)
Bebida MO a 10% (p/v) semente seca	6.03 ± 0.00	10.00 ± 1.32	2.97 ± 0.12	92.67 ± 0.05	0.24 ± 0.05	3.68 ± 0.02	0.44	43.19 ± 0.83 (179.87 ± 3.38)
Iogurte-tipo MO (4 h 30 min)	5.45 ± 0.02	46.70 ± 2.00	7.25 ± 0.47	81.10 ± 0.43	0.75 ± 0.05	14.73 ± 0.08	0.00	124.13 ± 4.46 (518.51 ± 18.38)

Quando comparados os valores de pH da bebida à base de MO (Tabela 3) com os obtidos para as bebidas à base de leguminosas de um estudo anterior (LOPES *et al.*, 2020), há alguma semelhança com as bebidas à base de tremçoço (pH < 6,0) ligeiramente ácidas, e menos com as bebidas à base de grão-de-bico (pH = 6,7–7,2).

A acidificação foi alcançada durante a fermentação (46,7 mEq/L) sendo confirmada pelo valor de pH mais baixo (5,45) do iogurte-tipo à base de MO, comparativamente à bebida, o que também evidencia a atividade das bactérias lácticas (BÉAL & HELINCK, 2019). Tal como esperado, o baixo teor em hidratos de carbono (cerca de 1,76%) da bebida à base de MO, que continha 40% (p/v) de sementes secas, foi consumido por bactérias ácido-láticas durante a fermentação (BÉAL & HELINCK, 2019), o que explica a ausência de hidratos de carbono no iogurte-tipo à base de MO (Tabela 3). Noutro estudo (QUINTANILHA *et al.*, 2021), a adição a iogurtes lácteos de extracto ultrafiltrado de sementes de *M. oleifera*, como agente espessante, evidenciou que a semente de MO fez aumentar a capacidade metabólica das bactérias ácido-láticas através dos seus ácidos orgânicos, ácidos fenólicos e flavonóides, provocando a rápida diminuição do pH e o aumento da acidez dos iogurtes lácteos fortificados, quando comparados com as amostras controlo. Os iogurtes lácteos fortificados com extracto de MO (QUINTANILHA *et al.*, 2021) apresentaram teores de gordura (5,97–6,32 vs. 7,25), de cinzas (0,95–0,98 vs. 0,75) e de humidade (77,38–77,89 vs. 81,10) semelhantes aos obtidos neste trabalho,

excepto no teor inferior em proteína (5,55–5,76 vs. 14,73) pois a proporção de extracto de MO adicionado era menor.

Os teores superiores em gordura, cinzas, proteína e valor energético do iogurte-tipo à base de MO, quando comparado com a bebida à base de MO (Tabela 3), devem-se à composição da sua fonte nutricional (bebida com 40% p/v de sementes secas), que é quatro vezes mais rica do que na bebida (10% p/v). Além disso, o teor relevante em proteína no iogurte-tipo à base de MO (14,73%), quando comparado com os iogurtes de soja e os iogurtes lácteos (4-5%), estabelece uma nova fonte de alto teor proteico potencial presente em alimentos à base de plantas, tornando-os altamente competitivos no mercado comercial actual de alimentos não lácteos.

O menor teor em humidade apresentado pelo iogurte-tipo à base de MO (81,1%) quando comparado com o da bebida à base de MO (contendo apenas 10% de sementes), é explicado pelos 40% de sementes de MO, responsáveis pela consistência “cremosa” do iogurte.

A cor de todas as amostras (dados não divulgados) difere das referências ($\Delta E^* > 12$), o que significa que a sua cor é visivelmente distinguida pelo olho humano (CASTELLAR et al., 2006).

A finalidade da fortificação de alimentos envolve a adição de nutrientes essenciais como as vitaminas e os minerais, a alimentos básicos, com o intuito de melhorar o seu valor nutricional, no entanto, este trabalho teve como objectivo utilizar a própria semente de MO como produto alimentar, de modo a que a sua composição nutricional proviesse apenas da semente submetida às diferentes condições de processamento.

Algumas diferenças foram encontradas entre os minerais quando comparado com a pouca literatura disponível sobre a composição de sementes cruas de *M. oleifera* (BRILHANTE et al., 2017; GOPALAKRISHNAN et al., 2016; IJAROTIMI et al., 2013). Essas variações podem decorrer de diferentes metodologias e instrumentos utilizados nas análises (espectroscopia de absorção atómica versus ICP-OES) juntamente com o uso de diferentes variedades de *M. oleifera*, condições edafo-climáticas, época de colheita e/ou estado nutricional das plantas, o que influencia os teores de minerais das sementes analisadas (ASANTE et al., 2014). No entanto, os teores dos seguintes elementos minerais descritos no trabalho de Ijarotimi (2013) são muito próximos aos encontrados neste estudo para as sementes cruas (Tabela 4): cálcio (128,33 mg/100 g), ferro (7,33 mg/100 g) e cobre (0,63 mg/100 g). Por outro lado, os teores em magnésio e enxofre encontrados nas sementes cruas de MO foram significativamente diferentes no trabalho de Gopalakrishnan (2016) (635 mg/100 g; 0,05 mg/100 g, respectivamente) quando

comparados com os apresentados neste trabalho (302.51 mg/100 g para o magnésio e 1994.06 mg/100 g para o enxofre).

Tabela 4. Teor em minerais nas sementes de *M. oleifera* (cruas e tostadas), bebida e iogurte-tipo à base de MO. Apresentação em percentagem da contribuição mineral de 100 mL de leguminosa e 100 g de semente ou iogurte, levando-se em conta as doses diárias de referência (DDR) para adultos (quantidade significativa de 7,5% para a bebida e 15% para as sementes e o iogurte) (Regulation (EC) No 1169/2011). Os valores são representados como a média ± DP. Letras diferentes, por elemento mineral, representam uma diferença significativa entre as amostras de sementes ($p < 0,05$).

	Semente crua de MO (mg/100 g)	% DDR	Semente tostada de MO (mg/100 g)	% DDR	Bebida à base de MO (mg/100 mL)	% DDR	iogurte-tipo de MO (mg/100 g)	% DDR
Na	6.82 ± 0.19 ^a	0.45	9.01 ± 0.78 ^b	0.60	3.14 ± 0.04	0.21	5.01 ± 0.04	0.33
K	763.49 ± 6.83 ^a	38.17	747.56 ± 6.38 ^b	37.38	38.08 ± 0.40	1.90	28.05 ± 0.14	1.40
Ca	139.64 ± 0.76 ^a	17.45	163.64 ± 1.46 ^b	20.45	17.86 ± 0.08	2.23	13.29 ± 0.12	1.66
Mg	302.51 ± 2.99 ^a	80.67	310.47 ± 3.34 ^b	82.79	29.31 ± 0.04	7.82	15.98 ± 0.15	4.26
P	771.19 ± 3.92 ^a	110.17	790.68 ± 4.89 ^b	112.95	72.24 ± 1.01	10.32	40.53 ± 0.19	5.79
S	1994.06 ± 51.42	—	1977.58 ± 23.44	—	156.54 ± 3.90	—	85.88 ± 1.20	—
Fe	9.97 ± 0.07 ^a	71.18	17.01 ± 0.05 ^b	121.52	0.50 ± 0.00	3.57	0.26 ± 0.00	1.84
Cu	0.86 ± 0.01 ^a	85.82	0.91 ± 0.02 ^b	90.52	0.08 ± 0.00	8.13	0.04 ± 0.00	3.85
Zn	5.20 ± 0.03 ^a	52.00	6.38 ± 0.02 ^b	63.81	0.56 ± 0.00	5.61	0.31 ± 0.00	3.09
Mn	1.25 ± 0.01 ^a	62.35	1.44 ± 0.00 ^b	72.17	0.15 ± 0.00	7.32	0.08 ± 0.00	3.77
B	0.58 ± 0.01 ^a	2.88	0.50 ± 0.01 ^b	2.49	0.00 ± 0.00	—	0.02 ± 0.00	0.11

De um modo geral, as sementes tostadas apresentaram um teor em minerais significativamente superiores quando comparadas às sementes cruas (Tabela 4), este facto é explicado pelo efeito da tostagem com relevante perda de humidade. As alegações nutricionais dos minerais presentes nas sementes tostadas podem ser consideradas, conforme apresentado na Tabela 4, para o magnésio, o fósforo, o ferro, o cobre, o zinco e o manganês, o que confirma a riqueza de sementes de *M. oleifera* em diversos minerais. A contribuição mineral por 100 g para a obtenção das doses diárias de referência (DDR) estabelecidas para adultos (Regulation (EC) No 1169/2011; 42], foi maior nas sementes de MO tostadas do que nos outros dois alimentos à base de sementes de MO estudados. Além disso, todos os elementos minerais analisados nas sementes tostadas de MO apresentaram valores superiores aos do amendoim torrado (por exemplo, Mg, 170 mg/100 g; P, 370 mg/100 g; Fe, 2,1 mg/100 g) (PortFIR, 2022).

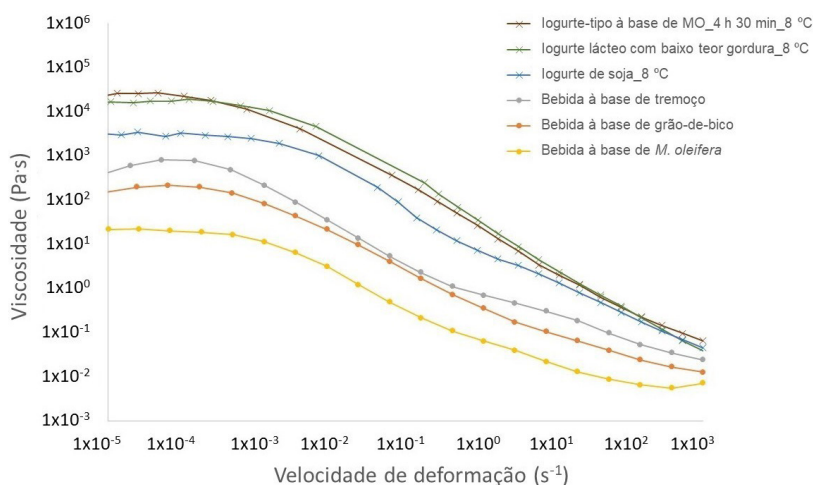
Tal como esperado, tanto a bebida como o iogurte-tipo à base de MO apresentaram valores de minerais inferiores aos das sementes cruas de MO (Tabela 4), isto pode ser devido à lixiviação ocorrida durante as etapas de demolha e cozedura. Como se sabe, as

bebidas comerciais e iogurtes-tipo não lácteos costumam apresentar grande discrepância de nutrientes em relação aos laticínios (MAKINEN et al., 2016; VANGA & RAGHAVAN, 2018), levando a potenciais deficiências nutricionais se não forem bem balanceados através da dieta alimentar (SCHOLZ-AHRENS et al., 2020). Geralmente, a composição das bebidas e dos iogurtes vegetais comerciais compreende diversos aditivos, incluindo minerais (especialmente cálcio), para mimetizar as características nutricionais dos produtos lácteos (MAKINEN et al., 2016; VANGA & RAGHAVAN, 2018), tal como o iogurte comercial de soja utilizado neste trabalho, com 15% de cálcio (igual ao valor mínimo de DDR) na sua composição. Apesar disso, quer a bebida à base de MO e o iogurte-tipo à base de MO podem ter as alegações nutricionais de cobre, zinco e manganês.

3.3 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DA BEBIDA E DO IOGURTE-TIPO À BASE DE *M. oleifera*

A consistência das alternativas lácteas à base de *M. oleifera* foram comparadas através do comportamento do fluxo à velocidade de deformação constante. Na Figura 2 pode-se ver a comparação entre a bebida à base de MO e as duas bebidas à base de leguminosas desenvolvidas anteriormente pelo nosso grupo de investigação, com outras bebidas não-lácteas alternativas atuais. As bebidas à base de MO, de grão-de-bico e de tremoço apresentaram um comportamento reofluidificante típico, não newtoniano, muito semelhante às bebidas comerciais de avelã (η_0 125,4 Pa·s) e de aveia (η_0 52,6 Pa·s), sendo esta última a preferida do consumidor (LOPES et al., 2020).

Figura 2. Curvas de viscosidade evidenciando os perfis das variações da viscosidade com a velocidade de deformação para a bebida à base de MO e para o iogurte-tipo à base de MO, em comparação com as bebidas à base de tremoço e de grão-de-bico, e também para o iogurte de soja comercial e o iogurte lácteo com baixo teor de gordura, respectivamente.



A bebida à base de MO evidenciou o comportamento reofluidificante mais baixo (η_0 17,4 Pa·s) comparativamente às bebidas das duas leguminosas (Figura 2 e Tabela 5). Isto deve-se à sua estrutura supramolecular mais fraca e portanto, mais facilmente destruída pela tensão aplicada, conduzindo ao rearranjo/ alinhamento das micro estruturas dentro do fluido de maneira a facilitar a deformação, atingindo mais cedo um segundo plateau newtoniano mais baixo. O comportamento reofluidificante da bebida à base de MO ainda se apresenta longe do da bebida de grão-de-bico (17,4 contra 176,4 Pa·s). Como o aumento da concentração em sementes de MO terá um impacto negativo pelo seu sabor amargo, uma possibilidade seria usar a fermentação láctica no processamento dessas bebidas, para reduzir o amargor e simultaneamente permitir incluir concentrações mais altas de MO, conduzindo à produção de produtos vegetais com alto teor em proteína.

Tabela 5. Parâmetros obtidos após o ajuste das curvas de viscosidade ao modelo Carreau para todas as bebidas e iogurtes (η_0 , viscosidade de deformação zero; η_∞ , viscosidade de deformação infinita; e $\dot{\gamma}^*c$, taxa de deformação crítica). Os valores são representados como média \pm desvio padrão ($n = 3$). As mesmas letras nas amostras por parâmetro, evidenciam diferenças significativas entre elas ($p < 0,05$).

	η_0 (Pa·s)	η_∞ (Pa·s)	$\dot{\gamma}^*c$ (s ⁻¹)
Iogurte-tipo MO_4 h 30 min_8 °C	21,465.7 \pm 2723.5 ^{b,c}	$3.3 \times 10^{-2} \pm 0.3 \times 10^{-2}$ ^a	$6.7 \times 10^{-4} \pm 0.4 \times 10^{-4}$ ^a
Iogurte lácteo com baixo teor gordura_8 °C	15,127.2 \pm 2013.4 ^{a,b}	$1.4 \times 10^{-2} \pm 0.4 \times 10^{-2}$ ^{a,b}	$26.6 \times 10^{-4} \pm 3.0 \times 10^{-4}$ ^{a,b}
Iogurte soja_8 °C	3381.2 \pm 277.1 ^{a,c}	$2.7 \times 10^{-2} \pm 0.2 \times 10^{-2}$ ^b	$11.0 \times 10^{-4} \pm 1.9 \times 10^{-4}$ ^b
Bebida à base de tremçoço	658.1 \pm 34.6 ^{d,e}	$2.9 \times 10^{-2} \pm 0.1 \times 10^{-2}$ ^{c,d}	$2.0 \times 10^{-4} \pm 0.5 \times 10^{-4}$ ^c
Bebida à base de grão-de-bico	176.4 \pm 22.4 ^{d,f}	$1.3 \times 10^{-2} \pm 0.1 \times 10^{-2}$ ^{c,e}	$5.6 \times 10^{-4} \pm 1.1 \times 10^{-4}$
Bebida à base de MO	17.4 \pm 3.1 ^{e,f}	$0.6 \times 10^{-2} \pm 0.0 \times 10^{-2}$ ^{d,e}	$8.1 \times 10^{-4} \pm 1.9 \times 10^{-4}$ ^c

O iogurte-tipo à base de MO apresentou uma curva de viscosidade muito semelhante à do iogurte lácteo com baixo teor em gordura, com um plateau newtoniano bem definido a baixas taxas de deformação, seguido pela região reofluidificante (Figura 2). O iogurte-tipo à base de MO incubado durante 4 h 30 min apresentou uma viscosidade de deformação zero mais prolongada (η_0 21.465,7 contra 3381,2 Pa·s) (Tabela 5), o que significa que a estrutura interna deste iogurte era mais forte do que a do iogurte de soja. Isto pode ser explicado pela sua maior concentração em proteínas, permitindo a estruturação do gel através do ácido láctico, a produção de exopolissacáridos pelas bactérias e o aumento de ligações proteicas formando uma rede forte (RAYMUNDO *et al.*, 2017), com efeito lubrificante a partir de seu teor em

gordura relevante, o que levou ao efeito crescente na redução da viscosidade induzida pela deformação (SHAKER *et al.*, 2000).

4 CONCLUSÕES

As estratégias de processamento adoptadas e as optimizações realizadas levaram ao desenvolvimento de alimentos à base de *Moringa oleifera*, tais como as sementes tostadas, e as alternativas não-lácteas de MO com várias características desejáveis (por exemplo, teor em proteínas e minerais, e a consistência) que podem ser consideradas potencialmente competitivas no mercado actual de produtos não-lácteos à base de plantas e também utilizadas como suplementos em dietas deficientes em proteínas e minerais nos países de origem desta planta.

O alto teor em proteína, a concentração baixa em gordura, e a riqueza em minerais da semente tostada de MO, comparativamente ao amendoim, torna esta oleaginosa um snack nutritivo e competitivo.

A fermentação láctica da bebida MO com 40% (p/v) de sementes secas conduziu a um produto de alto valor proteico com estrutura em gel semelhante ao iogurte lácteo, tornando-se uma nova alternativa promissora à base de plantas. Novos trabalhos serão necessários para avaliar a textura deste gel com base na caracterização sensorial.

No que diz respeito à bebida à base de MO (10% (p/v) de sementes secas), será necessário realizar outras optimizações no futuro, por forma a encontrar um processo mais eficiente para remover o sabor amargo das sementes cruas e obter uma bebida à base de MO mais agradável (por exemplo, tostar os grãos cozidos antes da moagem, proceder à fermentação láctica e/ou à adição de sabores naturais que possam melhorar a percepção sensorial). Todos esses aspectos estão sendo considerados em trabalhos em andamento e futuros.

5 FINANCIAMENTO

Este trabalho foi financiado pela FCT através do projeto da unidade de investigação UIDB/AGR/04129/2020-LEAF.

6 AUTORIZAÇÕES/ RECONHECIMENTO

Ao submeter o trabalho, os autores assumem responsabilidade por todo o conteúdo da obra.

REFERÊNCIAS

- AGOYI, E.E.; OKOU, F.A.Y.; ASSOGBADJO, E.A.; SINSIN, B. **Medicinal uses of *Moringa oleifera* in southern Benin (West Africa)**. *Acta Hort.* (2017) 1158:303–308. doi:10.17660/ActaHortic.2017.1158.34
- AOAC (2005) **Ash of Flour (Direct Method)**, Method 923.03. In: Official Methods of Analysis, 18th Edition, AOAC International Publisher, Gaithersburg, Maryland, USA.
- ASANTE, W.J.; NASARE, I.L.; TOM-DERY, D.; OCHIRE-BOADU, K.; KENTIL, K.B. **Nutrient composition of *Moringa oleifera* leaves from two agro ecological zones in Ghana**. *Afr. J. Plant Sci.* (2014) 8: 65–71. doi: 10.5897/AJPS2012.0727
- AYERZA, R. **Seed yield components, oil content, and fatty acid composition of two cultivars of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) growing in the Arid Chaco of Argentina**. *Ind. Crop Prod.* (2011) 33: 389–394. doi: 10.1016/j.indcrop.2010.11.003
- BANCESSI, A.; BANCESSI, Q.; BALDÉ, A.; CATARINO, L. **Present and potential uses of *Moringa oleifera* as a multipurpose plant in Guinea-Bissau**. *S. Afr. J. Bot.* (2020) 129: 206–208. doi: 10.1016/j.sajb.2019.06.013
- BARNES, H.A. Chapter 9: **Shear-thinning liquids**. In: Handbook of Elementary Rheology, 1st ed.; Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics, Department of Mathematics, University of Wales: Aberystwyth, UK. 2000. p. 55–61.
- BARTHET, V.J.; DAUN, J.K. Chapter 5 – **Seed Morphology, Composition, and Quality**. In: *Canola*, 1st ed.; DAUN, J.K.; ESKIN, N.A.M.; HICKLING, D.; Eds.; AOCS Press of the American Oil Chemists' Society: Champaign, IL, USA. (2011) p. 119–162.
- BÉAL, C.; HELINCK, S. **Fabrication des yaourts et des laits fermentés**. *Tech. Ing. Bioprocédés*. (2019) F6315 v2: 1–23. Available online at: <https://hal.science/hal-03519802>
- BENNETT, R.N.; MELLON, F.A.; FOID, N.; PRATT, J.H.; DUPONT, M.S.; PERKINS, L.; KROON, P.A. **Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multipurpose trees *Moringa oleifera* L. (Horseradish Tree) and *Moringa stenopetala* L.** *J. Agric. Food Chem.* (2003) 51: 3546–3553. doi: 10.1021/jf0211480
- BOSCH, C.H. In: GRUBBEN, G.J.H.; DENTON, O.A. (Eds.). *Moringa oleifera* Lam. [Internet] Record from PROTA4U. **PROTA (Plant Resources of Tropical Africa/Ressources végétales de l'Afrique tropicale)**, Wageningen, Netherlands; 2004. Available online at: <http://www.prota4u.org/> (accessed September 25, 2019).
- BRILHANTE, R.S.N.; SALES, J.A.; PEREIRA, V.S.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; CORDEIRO, R.A.; SAMPAIO, C.M.S.; PAIVA, M.A.N.; SANTOS, J.B.F.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Research advances on the multiple uses of *Moringa oleifera*: A sustainable alternative for socially neglected population**. *Asia Pac. J. Trop. Med.* (2017) 10: 621–630. doi: 10.1016/j.apjtm.2017.07.002
- CASTELLAR, M.; OBÓN, J.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. **The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colourant from *Opuntia stricta* fruits**. *J. Sci. Food Agric.* (2006) 86: 122–128. doi: 10.1002/jsfa.2285
- DUARTE, C.M.; MOTA, J.; ASSUNÇÃO, R.; MARTINS, C.; RIBEIRO, A.C.; LIMA, A.I.; RAYMUNDO, A.; NUNES, M.C.; FERREIRA, R.B.; SOUSA, I. **New alternatives to milk from pulses: Chickpea and lupin beverages with improved digestibility and potential bioactivities for human health**. *Front. Nutr.* (2022) 9: 1-12. Article 852907. doi: 10.3389/fnut.2022.852907

EUROPEAN COMMISSION. **Regulation (EC) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the Provision of Food Information to Consumers.** Available online at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R1169&from=pt> (accessed September 25, 2019).

FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; CARVALHO, A.F.U. **Moringa oleifera: Bioactive compounds and nutritional potential.** *Rev. Nutr.* (2008) 21: 431-437. doi: 10.1590/S1415-52732008000400007

FONTANA, A.J. **Water activity's role in food safety and quality.** *Food Safety Magazine*, 1 February 2001. Available online at: <https://www.food-safety.com/articles/4420-water-activitye28099s-role-in-food-safety-and-quality> (accessed April 22, 2022).

GHARSALLAH, K.; REZIG, L.; MSAADA, K.; CHALH, A.; SOLTANI, T. **Chemical composition and profile characterization of Moringa oleifera seed oil.** *S. Afr. J. Bot.* (2021) 137: 475-482. doi: 10.1016/j.sajb.2020.11.014

GOPALAKRISHNAN, L.; DORIYA, K.; KUMAR, D.S. **Moringa oleifera: A review on nutritive importance and its medicinal application.** *Food Sci. Hum. Wellness* (2016) 5: 49–56. doi: 10.1016/j.fshw.2016.04.001

GUPTA, S.; JAIN, R.; KACHHWAHA, S.; KOTHARI, S.L. **Nutritional and medicinal applications of Moringa oleifera Lam. – Review of current status and future possibilities.** *J. Herb. Med.* (2018) 11: 1-11. doi: 10.1016/j.hermed.2017.07.003

IJAROTIMI, O.S.; ADEOTI, O.A.; ARIYO, O. **Comparative study on nutrient composition, phytochemical, and functional characteristics of raw, germinated, and fermented Moringa oleifera seed flour.** *Food Sci. Nutr.* (2013) 1: 452–463. doi: 10.1002/fsn3.70

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11035 – Sensory Analysis – Identification and Selection of Descriptors for Establishing a Sensory Profile by a Multidimensional Approach**, 1st ed.; ISO: Geneva, Switzerland. 1994;1–26.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 2446. Milk – Determination of Fat Content**, 2nd ed.; ISO: Geneva, Switzerland. 2008;1–12.

INTERNATIONAL ORGANIZATION OF VINE AND WINE. Type I methods: **Total Acidity** (OIV-MA-AS313-01: R2015). In: *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*; IOVV: Paris, France. 2019; Volume I.

KHANDELWAL, S.; UDIPI, S.A.; GHUGRE, P. **Polyphenols and tannins in Indian pulses: Effect of soaking, germination and pressure cooking.** *Food Res. Int.* (2010) 43: 526–530. doi: 10.1016/j.foodres.2009.09.036

KUKU-SHITTU, O.; ONABANJO, O.; FADARE, O.; OYEYEMI, M. **Child malnutrition in Nigeria: evidence from Kwara State** (2016). Available online at: https://nssp.ifpri.info/files/2016/08/NSSP-WP-33-Child-Malnutrition-in-Nigeria_July-2016.pdf (accessed April 28, 2022).

LALAS, S.; TSAKNIS, J. **Characterization of Moringa oleifera seed oil variety “Periyakulam 1”.** *J. Food Compos. Anal.* (2002) 15: 65–77. doi: 10.1006/jfca.2001.1042

LEONE, A.; SPADA, A.; BATTEZZATI, A.; SCHIRALDI, A.; ARISTIL, J.; BERTOLI, S. **Moringa oleifera seeds and oil: Characteristics and uses for human health.** *Int. J. Molec. Sci.* (2016) 17(12): 2141. doi: 10.3390/ijms17122141

- LIN, M.; ZHANG, J.; CHEN, X. **Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties.** *J. Funct. Foods* (2018) 47: 469–479. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.06.011>
- LOPES, M.; PIERREPONT, C.; DUARTE, C.M.; FILIPE, A.; MEDRONHO, B.; SOUSA, I. **Legume beverages from chickpea and lupin, as new milk alternatives.** *Foods*. (2020) 9: 1458. doi: [10.3390/foods9101458](https://doi.org/10.3390/foods9101458)
- MAKINEN, O.E.; WANHALINNA, V.; ZANNINI, E.; ARENDT, E.K. **Foods for special dietary needs: Non-dairy plant-based milk substitutes and fermented dairy-type products.** *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2016) 56: 339–349. doi: [10.1080/10408398.2012.761950](https://doi.org/10.1080/10408398.2012.761950)
- MISHRA, S.P.; SINGH, P.; SINGH, S. **Processing of *Moringa oleifera* leaves for human consumption.** *Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci.* (2012) 2: 28–31. Available online at: <https://www.researchgate.net/publication/257817208>
- NELSON, A.I.; STEINBERG, M.P.; WEI, L.S. **Illinois process for preparation of soymilk.** *J. Food Sci.* (1976) 41: 57–61. doi: [10.1111/j.1365-2621.1976.tb01100.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1976.tb01100.x)
- OGUNSINA, B.S.; RADHA, C.; INDRANI, D. **Quality characteristics of bread and cookies enriched with debittered *Moringa oleifera* seed flour.** *Int. J. Food Sci. Nutr.* (2011) 62: 185–194. doi: [10.3109/09637486.2010.526928](https://doi.org/10.3109/09637486.2010.526928)
- OYEYINKA, A.T.; OYEYINKA, S.A. ***Moringa oleifera* as a food fortificant: Recent trends and prospects.** *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* (2018) 17: 127–136. doi: [10.1016/j.jssas.2016.02.002](https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.02.002)
- ÖZCAN, M.M. ***Moringa* spp.: Composition and bioactive properties.** *S. Afr. J. Bot.* (2018) 129: 25–31. Doi: [10.1016/j.sajb.2018.11.017](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.11.017)
- PAN, Z.; TANGRATANAVALEE, W. **Characteristics of soybeans as affected by soaking conditions.** *LWT Food Sci. Technol.* (2003) 36: 143–151. doi: [10.1016/S0023-6438\(02\)00202-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00202-5)
- PortFIR. **Composição de Alimentos.** Available online at: <http://portfir.insa.pt/foodcomp/search> (accessed April 28, 2022).
- QUINTANILHA, G.E.O.; BAPTISTA, A.T.A.; GOMES, R.G.; VIEIRA, A.M.C. **Yogurt production added ultrafiltered seed extract of *Moringa oleifera* Lam.** *Biocatal. Agric. Biotechnol.* (2021) 37: 102159. doi: [10.1016/j.bcab.2021.102159](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102159)
- RAYMUNDO, A.; BATISTA, A.; SOUSA, I. Chapter 4: **Rheology applied to food product design.** In: *Advances in Rheology Research*, 1st ed.; Pérez MDT, Ed.; Nova Science Publishers, Inc.: New York, NY, USA. 2017. p. 63–118.
- ROCKWOOD, J.; ANDERSON, B.; CASAMATTA, D. **Potential uses of *Moringa oleifera* and an examination of antibiotic efficacy conferred by *M. oleifera* seed and leaf extracts using crude extraction techniques available to underserved indigenous populations.** *Int. J. Phytother. Res.* (2013) 3: 61–71. Available online at: <https://typeset.io/papers/potential-uses-of-moringa-oleifera-and-an-examination-of-2hdqctg66k>
- SAINI, R.K.; SIVANESAN, I.; KEUM, Y.S. **Phytochemicals of *Moringa oleifera*: A review of their nutritional, therapeutic and industrial significance.** *3 Biotech.* (2016) 6: 203. doi: [10.1007/s13205-016-0526-3](https://doi.org/10.1007/s13205-016-0526-3)
- SCHOLZ-AHRENS, K.E.; AHRENS, F.; BARTH, C.A. **Nutritional and health attributes of milk and milk imitations.** *Eur. J. Nutr.* (2020) 59: 19–34. doi: [10.1007/s00394-019-01936-3](https://doi.org/10.1007/s00394-019-01936-3)

SETHI, S.; TYAGI, S.K.; ANURAG, R.K. **Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: A review.** *J. Food Sci. Technol.* (2016) 53: 3408–3423. doi: 10.1007/s13197-016-2328-3

SHAKER, R.R.; JUMAH, R.Y.; ABU-JDAYIL, B. **Rheological properties of plain yogurt during coagulation process: Impact of fat content and preheat treatment of milk.** *J. Food Eng.* (2000) 44: 175-180. doi: 10.1016/S0260-8774(00)00022-4

THE NATIONAL ACADEMIES PRESS. (2019) **Dietary Reference Intakes (DRIs): Elements.** Retrieved from Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies. Available online at: www.nap.edu (accessed April 29, 2022).

TRINDADE, C.; TERZI, S.; TRUGO, L.; MODESTA, R.; COURI, S. **Development and sensory evaluation of soymilk based yogurt.** *Arch. Latinoam. Nutr.* (2001) 51: 100–104. Available online at: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222001000100014

VANGA, S.K.; RAGHAVAN, V. **How well do plant based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk?** *J. Food Sci. Technol.* (2018) 55: 10–20. doi: 10.1007/s13197-017-2915-y

CAPÍTULO 9

DYNAMICS OF TOTAL ANTIOXIDANT STATUS THROUGHOUT THE WINE PRODUCTION PROCESS: FROM JUICE TO FINISHED NON-ALCOHOLIC WINE PRODUCT

Data de submissão: 20/06/2024

Data de aceite: 03/07/2024

Daina Garokalna

“Garkalnes mājas vīni” Ltd
Garkalne, Ropaži district, Latvia

Andrejs Skesters

Scientific Laboratory of Biochemistry
of Institute of Occupational Safety and
Environmental Health of
Riga Stradiņš University
Riga, Latvia
<https://orcid.org/0000-0003-3726-8724>

Anna Lece

Laboratory of Biochemistry of
Institute of Occupational Safety and
Environmental Health of
Riga Stradiņš University
Riga, Latvia
<https://orcid.org/0000-0002-0970-2127>

Dmitrijs Kustovs

Laboratory of Biochemistry of
Institute of Occupational Safety and
Environmental Health of
Riga Stradiņš University
Riga, Latvia
<https://orcid.org/0000-0001-8788-0204>

Gundega Gerke

Laboratory of Biochemistry of
Institute of Occupational Safety and
Environmental Health of
Riga Stradiņš University
Riga, Latvia

ABSTRACT: Aim: To quantify the biologically active substances (antioxidants and antiradicals) in berry and fruit juices, and in the resulting wines. Additionally, to determine whether wines lose their antioxidant potential during the de-alcoholization process. **Methods:** We utilized internationally recognized standard analytical methods to measure the levels of biologically active substances. **Results:** Our research allowed us to assess the antioxidant capacity of certain berry and fruit juices. We found that this capacity remains largely unchanged during the winemaking process. Furthermore, wines with low alcohol content or alcohol-free wines produced using our technology retain their antioxidant and antiradical properties. **Conclusion:** Wine is an excellent product containing many antioxidants that can contribute to the regulation of RedOx status in the body. It acts as an effective scavenger and/or inactivator of free radicals and reactive oxygen species, which cause oxidative stress.

KEYWORDS: Antioxidants. Polyphenols. Non-alcoholic wine.

DINÂMICA DO ESTADO ANTIOXIDANTE TOTAL AO LONGO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE VINHO: DO SUMO AO PRODUTO VINHO NÃO ALCOÓLICO ACABADO

RESUMO: **Objetivo:** Quantificar as substâncias biologicamente ativas (antioxidantes e antirradicais) em sucos de frutas vermelhas e frutas, e nos vinhos resultantes. Além disso, determinar se os vinhos perdem seu potencial antioxidante durante o processo de desalcolização. **Métodos:** Utilizamos métodos analíticos padrão internacionalmente reconhecidos para medir os níveis de substâncias biologicamente ativas. **Resultados:** Nossa pesquisa permitiu avaliar a capacidade antioxidante de certos sucos de frutas vermelhas e frutas. Constatamos que essa capacidade permanece amplamente inalterada durante o processo de vinificação. Além disso, vinhos com baixo teor alcoólico ou vinhos sem álcool produzidos utilizando nossa tecnologia mantêm suas propriedades antioxidantes e antirradicais. **Conclusão:** O vinho é um excelente produto que contém muitos antioxidantes que podem contribuir para a regulação do estado RedOx no corpo. Ele atua como um eficiente eliminador e/ou inativador de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, que causam estresse oxidativo.

PALAVRAS-CHAVE: Antioxidantes. Polifenóis. Vinho sem álcool.

1 INTRODUCTION

The history of wine spans many millennia. It has been known to many cultures in the southern regions, primarily as grape wine. Berry, fruit, and “exotic” wines have a much more recent history. In the modern world, we classify wines by their region of production, grape varieties, growing conditions, climate, production methods, colour, aroma and flavour profiles, sweetness levels, and other characteristics. Additionally, wines can be analyzed based on their bioactive substances, tannins, polyphenols, vitamins, trace elements, and compounds with antioxidant and antiradical effects.

In recent years, wines with reduced or low alcohol content, as well as alcohol-free wines, have gained popularity. Such wines are produced through additional processes that may partially or completely alter their specific properties, including bioactive substances. Both the mutual relations and the quantitative content of these substances can change. This article examines the possible changes in biologically active substances from juice through the winemaking stages to the final wine, including the de-alcoholization process. Preserving the quantity and composition of these biologically active substances is considered a crucial aspect. Modern analytical methods were used in the study to quantify bioactive substances and evaluate their antioxidative (TAS) and antiradical (FRAP) potency.

Many decades ago, Benjamin Franklin famously said, “Wine is proof that God loves us and loves to see us happy!” (*Grigalis U, 2022*). Wine, whether made from grapes, berries, or fruits, is influenced by numerous direct and indirect factors that can significantly affect

the properties of the final product. Wine enthusiasts are divided into two groups: those who believe that good wine comes from high-quality grapes or berries, and those who believe that the winemaker's experience and skills are paramount. In our study, we will not evaluate the skills of winemakers but will focus on the process of making wine from juice to finished wine, including the de-alcoholization process to produce both low-alcohol and non-alcoholic wines.

While the history of well-maintained vineyards dates back to ancient times around 4000 BCE, the history of wines made from other berries, fruits, and exotic sources is much more recent, often only a few centuries old. Different regions use a variety of berries, fruits, and even vegetables for winemaking. Our research includes berries and fruits traditional to the Baltic and Latvian regions. Notably, Latvian gardeners have adapted hundreds of grape varieties to the local climate, thanks to breeders like P. Sukatnieks and A. Fazekas, whose varieties compete in European and global markets. Latvian winemakers, while producing traditional berry, fruit, and exotic wines, are increasingly focusing on grape wines. However, in this article, we will analyze the berry and fruit wines typical of Latvia and the Baltics, focusing on their biological value.

Among the most popular berries and fruits used in Latvian winemaking are: Aronia (*Aronia melanocarpa*), known for its high anthocyanin content (41%) in various forms of cyanidin-glycosides (WICZKOWSKI e colab., 2010), and Raspberries (*Rubus idaeus* L.), containing natural antioxidants like vitamins C and E, flavanols, phenolic acids, ellagitannins, β -sitosterol, and folic acid. The antioxidant properties of raspberries are mainly due to anthocyanins and ellagitannins. Cranberries (*Oxycoccus quadripetalus* Gilib.), Blueberries (*Vaccinium myrtillus* L.), Strawberries (*Fragaria grandiflora* Ehrh.), Gooseberries, Rowanberries (*Grossularia reclinata* L.), Red Currants (*Ribes rubrum* L.), White Currants (*Ribes vulgare* Lam.), Plums (*Prunus* sp. L.), Cherries, Apples (*Malus domestica* Brokh.), Quinces (*Cydonia japonica* L.), and several plants used to make exotic wines, such as Dandelion (*Taraxacum officinale* F.H.Wigg.) and Rhubarb (*Rheum rhaponticum* L.), are also significant. All these plants, whether fruits, berries, or parts thereof, are traditionally used in folk medicine for disease prevention and treatment (LAGZDINA Z., 2017).

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 MEASUREMENTS OF THE TAS

The Total Antioxidant Status (TAS) in the juice and wine was measured using the Total Antioxidant Status commercial assay kits (Cat. NX2332, Randox Laboratories

Ltd., Crumlin, UK), adapted to the RX Daytona™ automated chemistry analyzer (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK) following the manufacturer's instructions. Briefly, the assay is based on the formation of the ferryl myoglobin radical from metmyoglobin and hydrogen peroxide, which then oxidizes ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) to produce the radical cation (ABTS•+), a green soluble chromogen, determined spectrophotometrically. Antioxidants scavenge the formed cation-radical in a concentration-dependent manner, leading to a proportional decrease in colour intensity. Assay results are expressed as mmol/L. This measurement considers the cumulative effect of all antioxidants present in the extract under investigation (MILLER e colab., 1993).

2.2 MEASUREMENTS OF THE TPC

The Total Phenolic Content (TPC) in the sapropel extract was determined spectrophotometrically using a UV-Visible spectrophotometer (UV-Vis Varian Cary 50, Seattle, USA) and the widely used Folin-Ciocalteu method (BLAINSKI e colab., 2013; ISO, 2005). This method is based on the oxidation of phenol –OH groups in reaction with the Folin-Ciocalteu reagent, a mixture of phosphomolybdate and phosphotungstate, producing a blue coloration with an absorption at 765 nm. The colour intensity is proportional to the phenol concentration. The reducing capacity of the Folin-Ciocalteu reagent depends on the presence of –OH groups in polyphenols. First, 2.5 mL of 10% Folin-Ciocalteu reagent was added to a 0.5 mL sapropel extract sample, mixed, and incubated at room temperature for 3–8 minutes. Then, 2.0 mL of 7.5% sodium bicarbonate was added, mixed, and incubated for 30 minutes at room temperature. The absorbance was measured at 765 nm against a blank sample. The phenolic compound content in the extract was expressed as gallic acid equivalents ($\mu\text{g GAL/mL}$). Gallic acid was used to set up a standard curve with concentrations of 100, 50, 25, 12.5, and 6.25 $\mu\text{g GAL/mL}$. Samples were analyzed in triplicate (BLAINSKI e colab., 2013).

2.3 MEASUREMENTS OF THE FRAP

The Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay was performed according to the method described by Benzie and Strain (BENZIE e STRAIN, 1999). The FRAP reagent was freshly prepared by mixing 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 10 mM TPTZ dissolved in 40 mM HCl, and 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solution in a 10:1:1 ratio. Three milliliters of freshly prepared working FRAP reagent were mixed with 0.2 mL of the sample extract. The mixture was incubated at 37°C for 5 minutes. The absorbance was measured at 593 nm against a reagent blank. The FRAP value was calculated and expressed as $\text{mM Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$

of product, based on a calibration curve plotted using an aqueous solution of 1 mM ferrous sulphate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (BENZIE e STRAIN, 1999).

3 RESULTS AND DISCUSSION

In the initial phase, our goal was to monitor the changes in polyphenols, antioxidants (TAS), and antiradicals (FRAP) from juice to the final wine product. We evaluated 18 wines in total, including 11 berry, 4 fruit, and 2 exotic wines. We measured the quantities of polyphenols, total antioxidative capacity, and the ability to bind free radicals (antiradical potencies) in both the juices and the finished wines. The total polyphenolic compounds in the wines were quantified in $\mu\text{g/mL}$. To determine the polyphenolic compounds, we used a scanning UV/VIS spectrophotometer “Cary 50” (Varian, The Netherlands) and the standardized Folin-Ciocalteu method (ISO 14502-1:2005, 2015), with gallic acid as the standard. The measurement of total polyphenols was expressed as gallic acid equivalent (GAE) $\mu\text{g/mL}$. Initially, we analyzed the prepared juice before commencing the winemaking process. The qualitative composition of bioactive substances was determined from our previous studies and publicly available data (LAGZDINA, 2017; KUSTOVŠ e colab., 2020; MOREINO e colab., 2021). Throughout the study, we observed the highest concentrations of polyphenols in chokeberry, blackcurrant, red currant, and quince juice and wine. Chokeberry juice and wine were dominated by anthocyanins and flavanols, including quercetin and kaempferol. In blackcurrant juice and wine, anthocyanins and quercetin primarily determined the antioxidant and antiradical properties. For red currants, quercetin and its derivatives, β -carotenes, lutein, and zeaxanthin contributed to their bioactive potency. Quince juice and wine’s bioactive potency comprised anthocyanins, rutin, chlorogenic, and caffeic acids. Antiradical potencies, assessed by the FRAP method, demonstrated the capability of substances in berry and fruit juices and wines to bind and neutralize free radicals and reactive oxygen species. Aronia juice exhibited the highest antiradical potency (11.3 mM Fe^{2+}), followed by blackcurrant (9.9 mM Fe^{2+}), quince (10.5 mM Fe^{2+}), and cherry (8.8 mM Fe^{2+}). The finished wines showed similar antiradical potencies: aronia (11.3 mM Fe^{2+}), blackcurrant (10.1 mM Fe^{2+}), quince (10.0 mM Fe^{2+}), and cherry (9.5 mM Fe^{2+}). These findings convincingly demonstrate that traditional winemaking methods (employed by Latvian winemakers) effectively preserve the bioactive substances responsible for the antioxidant and antiradical properties of wine. This suggests that wine can significantly regulate RedOx processes in the body and reduce oxidative stress by influencing various metabolic processes, including enzymatic and non-enzymatic regulation. A notable

aspect is the wide spectrum of biologically active substances in any wine, enabling each free radical in the body and each reactive form of oxygen and/or nitrogen to find its own “regulator.” This contributes to both endogenous antioxidative regulation and exogenous antioxidant defence processes. To substantiate this, we evaluated the total antioxidant potential in juices, finished wines, wines with reduced alcohol content, and non-alcoholic wines. TAS in juice and wine was measured using the Total Antioxidant Status commercial assay kits (Cat. NX2332, Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK) adapted to the RX Daytona™ automated chemistry analyzer (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK) following the manufacturers’ instructions. Aronia juice exhibited the highest antioxidant protection potential (33.2), with aronia wine showing 33.9. Blackcurrant juice and wine showed 19.0 and 18.7, respectively, blueberry 18.0 and 16.8, quince 18.1 and 18.7, and red currant 17.0 and 16.0 (SKESTERS e colab., 2023). These results justify categorizing wines as preventive agents, as they are known to help in the prevention of cardiovascular diseases and reducing the risk of their development. The results of the study are summarized in Tables 1 and 2 (see below).

Table 1. Total antioxidant status and content of polyphenols and Ferric Reducing/Antioxidant power in juice.

Juice from the following berries	TAS (mmol/L)	TPC (GAE, µg/mL)	FRAP (mM Fe ₂ ⁺)
Aronia (<i>Aronia melanocarpa</i>)	33.2	2214	11.3
Black currant (<i>Ribes nigrum L.</i>)	19	1606	9.9
Red currant (<i>Ribes rubrum L.</i>)	17	1244	7.5
White currant (<i>Ribes vulgare Lam.</i>)	4	300	2.7
Rowanberry (<i>Grossularia reclinata (L.) Mill.</i>)	3.6	417	4.1
Strawberry (<i>Fragaria grandiflora Ehrh., Fragaria ananassa Duch.</i>)	3.7	564	3.8
Cranberry (<i>Oxycoccus quadripetalus Gilib.</i>)	5.7	354	4.9
Lingonberry (<i>Vaccinium vitis-idaea</i>)	16.8	1146	8
Blueberry (<i>Vaccinium myrtillus L.</i>)	18	970	8.1
Raspberry (<i>Rubus idaeus L., Rubus odoratus</i>)	12.4	615	7.8
Red grape (<i>Vitis vinifera</i>)	12.5	978	6.7
Quince (<i>Cydonia japonica L., Chaenomeles japonica Thunb</i>)	18.1	1308	10.5
Cherry (<i>Prunus avium</i>)	11.4	952	8.8
Plum (<i>Prunus sp. L.</i>)	6.3	440	5.1
Apple (<i>Malus domestica Brokh.</i>)	9.4	714	5.3
Dandelion (<i>Taraxacum officinale F.H.Wigg. s.l.</i>)	12.8	914	10.7
Rhubarb (<i>Rheum rhaponticum L.</i>)	1.2	114	2.2

The total phenolic content of the wine samples was determined using a modified Folin-Ciocalteu method, adapted for a microplate, according to the ISO standard protocol (ISO, 2005). Results were expressed as gallic acid equivalents in µg/mL of wine.

Table 2. Total antioxidant status and content of polyphenols and Ferric Reducing/Antioxidant power in red wine.

Red wine from	TAS mmol/L	TPC GAE, µg/mL	FRAP
Aronia (<i>Aronia melanocarpa</i>)	33.9	2334	11.3
Black currant (<i>Ribes nigrum</i> L.)	18.7	1696	10.1
Red currant (<i>Ribes rubrum</i> L.)	16	1249	7.9
White currant (<i>Ribes vulgare</i> Lam.)	4.2	287	2.6
Rowanberry (<i>Grossularia reclinata</i> (L.) Mill.)	3.9	477	4.1
Strawberry (<i>Fragaria grandiflora</i> Ehrh., <i>Fragaria ananassa</i> Duch.)	3.2	545	3.9
Cranberry (<i>Oxycoccus quadripetalus</i> Gilib.)	6.2	392	4.6
Lingonberry (<i>Vaccinium vitis-idaea</i>)	17.4	1286	8.1
Blueberry (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	16.8	1020	8.1
Raspberry (<i>Rubus idaeus</i> L., <i>Rubus odoratus</i>)	12.4	615	7.8
Red grape (<i>Vitis vinifera</i>)	14.5	1033	7.7
Quince (<i>Cydonia japonica</i> L., <i>Chaenomeles japonica</i> Thunb)	18.7	1218	10
Cherry (<i>Prunus avium</i>)	10.4	902	9.5
Plum (<i>Prunus</i> sp. L.)	6.6	429	4.9
Apple (<i>Malus domestica</i> Brokh.)	7.4	773	5.3
Dandelion (<i>Taraxacum officinale</i> F.H.Wigg. s.l.)	12.8	901	10.1
Rhubarb (<i>Rheum rhaponticum</i> L.)	1.4	136	2.4

In recent years, there has been a growing trend in society towards increased demand for low-alcohol and non-alcoholic wines, which also impacts winemakers in Latvia. Given the relatively small wine consumption in the Baltic States and Latvia, and the minor share of these specific wine groups in the overall market, it is unfeasible for small wineries to invest in expensive equipment such as reverse osmosis systems costing around \$30,000 or spinning cone columns exceeding \$1 million (GOODE, 2021). Our laboratory's objective was to identify and test cost-effective technologies for reducing alcohol content to 8-6% or even zero v/v%. One potential method involved "freezing" the wine. The wine was frozen to -30°C, and after removal from the freezer, the bottle was placed upside down in a rack. As the temperature increased, the alcohol, which has a higher freezing point than water, was the first to thaw and slowly flow out. The moment the wine began to melt was determined both visually and photometrically; the first drops

indicated the start of melting. This freeze-thaw procedure was repeated three times during our experiment. After each thawing cycle, the total polyphenol content (TPC) in the wine was measured. The increase in TPC was attributed to the reduced volume of wine due to alcohol separation. The total polyphenol content and alcohol levels in the samples are shown in Table 3. As another method for reducing alcohol content, we used vacuum distillation. Heidolph's vacuum distillation equipment (Heidolph Instruments, GmbH, Germany) allows for precise temperature control ($\pm 0.1^\circ\text{C}$), standardized rotation speed, and vacuum depth. The distillation process lasted 30 minutes, with a repeated cycle after a 5 minute pause for sampling. The distillation temperature was set at 45°C with a vacuum of 200 millibars. This process was repeated twice, with samples taken for analysis after each step. The results are shown in Table 4.

Table 3. Polyphenols (GAE $\mu\text{g}/\text{mL}$) and alcohol (v/v%) content in wine after triple freeze/thaw procedure.

Wine	Original TPC (GAE $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Alcohol v/v%	1st TPC (GAE $\mu\text{g}/\text{mL}$)	2nd TPC (GAE $\mu\text{g}/\text{mL}$)	3rd TPC (GAE $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Final Alcohol v/v%
Apple	185	13	193	198	212	6.55
Gooseberry	704	12.5-13.0	716	718	729	4.14
Rhubarb	166	12.5-13.0	175	179	179	3.41
Chokeberry	862	13	870	881	895	8.12

Table 4. Polyphenols (GAE $\mu\text{g}/\text{mL}$) and alcohol (v/v%) content in wine after vacuum distillation.

Wine	Original TPC (GAE $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Alcohol v/v%	$45^\circ\text{C} - 200$ mbar 30min TPC (GAE $\mu\text{g}/\text{mL}$)	$45^\circ\text{C} - 200$ mbar 30min Alcohol v/v%	$45^\circ\text{C} - 200$ mbar 60min TPC (GAE $\mu\text{g}/\text{mL}$)	$45^\circ\text{C} - 200$ mbar 60min Alcohol v/v%
Apple	205	12.5-13.0	218	9.7	220	6.8
Rhubarb	130	12.5-13.0	199	2.19	416	0.088
Hawthorn	848	13	859	9.76	872	3.65
Rowanberry	398	13	505	5.6	453	0.66
Apple/pear	227	13	240	2.49	259	0.8

By using the freeze/thaw method, we successfully avoided the loss of biologically active substances, mainly polyphenols. In fact, we observed an increase in polyphenol content per milliliter of wine. This can be explained by the significant reduction in alcohol volume. Despite the considerable drop in alcohol content across all wine samples, most could be classified as low-alcohol wines, except for chokeberry wine, which reached up to 8.12v%. The alcohol content in rhubarb wine decreased from 13.0 to 3.41v%, in gooseberry wine to 4.14v%, and in apple wine to 6.55v%.

The vacuum distillation method also preserved the antioxidant capacity of the wines, similar to the freeze/thaw method. However, the residual alcohol content (ranging from 0.088 to 0.80%) allows these wines to be classified as non-alcoholic. Meanwhile, the alcohol content in hawthorn (3.65v%) and apple (6.8v%) wines places them in the low-alcohol category.

4 CONCLUSION

During the winemaking process, the bioactive substances in the juice are preserved, ensuring the antioxidant capacity of the wine. Our evaluated methods for reducing alcohol in wine or de-alcoholizing wine are gentle and do not diminish the antioxidant potential of low-alcohol or non-alcoholic wines. We believe that wine plays a role in regulating the body's RedOx state, intercepting and neutralizing free radicals, thereby reducing the effects of oxidative stress on the body.

REFERENCES

- BENZIE, Iris F.F. e STRAIN, J. J. **Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration.** Methods in Enzymology, 1999.
- BLAINSKI, Andressa e LOPES, Gisely Cristiny e DE MELLO, João Carlos Palazzo. **Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from limonium brasiliense L.** Molecules, 2013.
- GOODE, Jamie. **The science of wine : from vine to glass / Jamie Goode.** Journal of Wine Economics, 2021.
- ISO, I S O. **14502-1: 2005, Determination of Substances Characteristic of Green and Black Tea – Part 1: Content of Total Polyphenols in Tea-Colorimetric Method Using Folin-Ciocalteu Reagent.** International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland. [S.l: s.n.], 2005.
- MILLER, N. J. e colab. **A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates.** Clinical Science, 1993.
- Moreino E, Kustovs D., Sitovs A., Skesters A., Garokalna D. **Determination of the antioxidant and antiradical activity in berry and fruit juices and wines.** International Research Conference on Medical and Health Care Sciences, KNOWLEDGE FOR USE IN PRACTICE, Abstracts 24-26 March, 2021 Riga, Latvia, p. 433.
- Kustovs D., Garokalna D., Skesters A. **Berry and fruit wines as a source of a natural antioxidants.** Thesis for 3rd International Conference “Nutrition and Health 2020”, 9 – 11. December 2020, Riga, Latvia.
- Lagzdīņa Zane.” **Determination of Antioxidants in Wine produced in Latvia**”, Title of Bachelor Thesis, Riga, 2017 (in latvian).

Skesters A., Lece A., Kustovs D., Garokalna D. **Dynamics of total antioxidant status throughout the wine production process: from juice to finished non-alcoholic wine product.** Abstract book, p.31. 3rd World Science & Wine Congress (Sustainability of wine production and food systems in the Mediterranean region), 14-15-16 June 2023, Porto, Portugal.

WICZKOWSKI, Wieslaw e ROMASZKO, Ewa e PISKULA, Mariusz K. **Bioavailability of cyanidin glycosides from natural chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juice with dietary-relevant dose of anthocyanins in humans.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010.

INSIGHTS INTO BROWN SPOT DISEASE: CAUSAL AGENTS AND HOST INTERACTIONS IN AGROECOSYSTEMS

Data de submissão: 10/06/2024

Data de aceite: 21/06/2024

Justino Sobreiro

Instituto Politécnico de Beja
Escola Superior Agrária
Rua Pedro Soares, 7800-295
Beja, Portugal

Center for Sci-Tech Research in
Earth Systems and Energy (CREATE)
University of Évora, 7000-671
Évora, Portugal

<https://orcid.org/0000-0001-8871-7409>

Cláudia Sofia Batalha Neto

Instituto Politécnico de Beja
Escola Superior Agrária
Rua Pedro Soares, 7800-295
Beja, Portugal

Center for Sci-Tech Research in
Earth Systems and Energy (CREATE)
University of Évora, 7000-671
Évora, Portugal

<https://orcid.org/0000-0002-3046-0556>

ABSTRACT: The Brown Spot Disease is a ubiquitous fungal disease present in many vegetables and perennials. The mycotoxins produced by the disease lead to challenges in plant protection. Moreover, the actual

fungicides are largely inadequate to deal with this disease aggressiveness. This aspect is a common feature of necrotrophic fungi. The studies on Brown Spot Disease were largely done by isolating the fungus from the infected tissues. Fungus belonging to *Stemphylium* sp. and *Alternaria* spp. were described on pear, apple, vegetables, and cover crops. The objective of this study was to obtain scientific evidence on the distribution of Brown Spot Disease over distinct plant species and clarify its infection mechanism. For that purpose, optical microscopy methods were used based on darkfield or polarized light, which build up significant steps for the comprehensive understanding of these fungus on their hosts. *Stemphylium vesicarium*, *Alternaria alternata* and *Alternaria arborescens* were associated to Brown Spot Disease symptoms. The fungus association and frequency depended on hosts and infected plant organs. In *Pyrus communis* cv. Rocha flowers *Alternaria* spp. were the most frequent. Later in the season, on maturation stage BBCH 85 *Stemphylium vesicarium* was the most frequent, particularly when the fruits turned yellow. It is likely that both *Stemphylium vesicarium* and *Alternaria* spp. act together to synergistically surpass the defence mechanisms of the hosts. The Brown Spot Disease pathosystem in Portugal is profusely diverse in pathogens and hosts.

KEYWORDS: *Stemphylium vesicarium*. *Alternaria alternata*. *Alternaria arborescens*. Light microscopy. Necrotrophic fungi.

ABORDAGEM SOBRE A DOENÇA DAS MANCHAS CASTANHAS: AGENTES CAUSAIS E INTERAÇÕES COM OS HOSPEDEIROS EM ECOSISTEMAS AGRÁRIOS

RESUMO: A doença das manchas castanhas é uma doença ubíqua que causa danos em muitas espécies frutícolas e olerícolas. Pelo facto de a doença produzir micotoxinas, a sua proteção torna-se difícil e os fungicidas pouco eficazes. Este aspeto é uma característica de todas as doenças causadas por fungos necrotróficos. Os trabalhos realizados sobre a doença das manchas castanhas têm-se baseado em amostragem por isolamento dos tecidos infetados, demonstrando a presença e infecciosidade de fungos dos géneros *Stemphylium* e *Alternaria* em pereira, macieira, hortaliças e coberturas vegetais. O objetivo deste trabalho é produzir evidência científica sobre a distribuição dos fungos causadores da doença das manchas castanhas em diferentes hospedeiros e do seu mecanismo de infeção. Para este propósito foram implementadas técnicas de microscopia ótica baseadas na utilização de luz polarizada e de campo escuro, que permitem avanços significativos na compreensão da ação destes fungos nos seus hospedeiros. Foram identificados e documentados visualmente fungos das espécies *Stemphylium vesicarium*, *Alternaria alternata* e *Alternaria arborescens* associados aos sintomas da doença das manchas castanhas, em combinação e representatividade diferentes consoante os hospedeiros e órgãos infetados. Em *Pyrus communis* cv. Rocha o género *Alternaria* predomina no período da floração, enquanto na fase de maturação dos frutos a espécie *Stemphylium vesicarium* é a preponderante. É possível que estes fungos atuem de forma cooperativa para ultrapassar as defesas normais das plantas hospedeiras. O patossistema associado a esta doença é muito rico, pela diversidade de patogénios e hospedeiros, observados em várias zonas de Portugal.

PALAVRAS-CHAVE: *Stemphylium vesicarium*. *Alternaria alternata*. *Alternaria arborescens*. Microscopia ótica. Fungos necrotróficos.

1 INTRODUCTION

The Brown Spot Disease (BSD) is an important disease of pear worldwide. Reports published in Portugal (Francisco, 2021), The Netherlands (Köhl et al., 2013), Spain (Llorente and Montesinos, 2006), Italy (Köhl et al., 2009), France (Blancard et al., 1989), Poland (Hubert Głós et al., 2023), Argentina (Temperini et al., 2022) and Belgium (Van Laer et al., 2006) claim that *Stemphylium vesicarium* is the causal agent of BSD on pear. Nevertheless, *Alternaria* spp. can also cause symptoms compatible with those caused by *Stemphylium vesicarium* and this is often disregarded. The *Alternaria* spp. related with European pear hosts are *Alternaria alternata*, *Alternaria arborescens* and *Alternaria tenuissima*. Joyce Woudenberg (Woudenberg, 2015; Woudenberg et al., 2015) claimed that *A. tenuissima* is the same as *A. alternata*.

The aim of this study was to clarify the symptoms of both fungus and its relationship with different hosts, both perennial and annual species.

2 MATERIALS AND METHODS

From 2018 to 2020 two *Pyrus communis* cv. Rocha orchards were selected and winter buds, flowers, leaves and fruits were observed. From the two selected orchards, the one located in coordinates 39°19'5.82"N, 9°2'45.84"W (elevation 57 m) had historically low level of BSD (<3% on fruits) whereas the other, located at 39°19'40.20"N, 9°3'51.29"W (elevation 142 m) presented high levels of the disease (> 10% on fruits). Each year, 100 organs were selected: in wintertime (January and February) dormant flower buds were sampled, flowers in April, and from mid-June to mid-July leaves and fruits were collected and observed. Fruits were also observed in the week before harvest (mid-August).

In the high inoculum orchard, 50 fruits were sampled before and after spraying treatments in May and June (three times in total). The spray treatments were done with an air blast sprayer model Stagric 800 I (Stagric, Portugal).

Fruit samples were also collected on bell pepper (*Capsicum annum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), fig trees (*Ficus carica*), cover crops (*Lolium* spp., *Sonchus oleraceus* and *Helminthotheca echioides*) and vineyard leaves (*Vitis vinifera*) on several locations in Western Portugal (Caldas da Rainha) and Southern Portugal (Beja, only in 2020).

The organs were observed under a stereomicroscope Leica 205C (Leica Germany) equipped with a NVI illumination, polarization filters and a MC190 HD camera. The leaves were also observed with an Olympus BX40 (Olympus, Japan) microscope in transmission mode (40 x) equipped with a darkfield set. Some photos were stacked to improve the depth of the field. The distinction between *A. alternata* and *A. arborescens* was done based on fungus morphology from undisturbed architecture on the host's surface. It was assumed that *A. tenuissima* and *A. alternata* are the same species (Woudenberg, 2015; Woudenberg et al., 2015).

3 RESULTS AND DISCUSSION

Spores and symptoms of BSD were identified in several perennial hosts such as *Pyrus communis* (Figure 1 A-O), *Ficus carica* (Figure 1 P-Q) and *Vitis vinifera*. Vegetables like *Capsicum annum* and *Solanum lycopersicum* (Figure 1 R) were also infected and produced spores similarly to several cover crops (*Lolium* spp., *Sonchus oleraceus* and *Helminthotheca echioides*). In all those species *S. vesicarium*, *A. alternata* and *A. arborescens* were identified. In case of *Lolium* spp. the *Alternaria* spp. present could be *A. alternata* or *A. infectoria*. The last one is quite common in cereal crops and humans, and it is hard to distinguish them based on morphology. As far as we know, the infections of

A. infectoria on plants were just reported for vegetables (Henriques, 2018; Kokaeva et al., 2018) and cereal species (Tralamazza et al., 2018).

In the initial leaf and fruit infection stage, it was possible to connect the symptoms to the spore responsible for the infection of the living tissues (Figure 1A-B). The cases where the relation was dubious were discarded. Thus, it was possible to establish a clear link between the symptoms associated with *S. vesicarium* and those caused by other *Alternaria* spp., namely *A. alternata* and *A. arborescens* on pear.

3.1 LEAF INFECTIONS

The infections caused by *S. vesicarium* and *Alternaria* spp. did not always develop a red halo on pear (Figure 1 D-G). Sporulation of *S. vesicarium* was never observed on pear leaves during the three years of the study. On the other hand, abundant sporulation on pear leaf lesions of *Alternaria* spp. was frequently found (Figure 1 C). The lesions on *V. vinifera* leaves produced abundant sporulation for both genera (*Alternaria* and *Stemphylium*, data not shown).

The presence of airborne *S. vesicarium* ascospores was often observed infecting both sides of the pear leaf. On the opposite, *S. vesicarium* conidia were rare to be observed on pear leaf blades. The reason behind this fact is unknown, as both spores can be collected from the atmosphere (Sobreiro et al., 2003).

In *S. vesicarium* and *Alternaria* spp. the spores produced multiple penetration hyphae that spread on host surface three to four times the spore length before the penetration site (Figure 1 A-B). In the leaves, direct penetration was the most frequent, but we also reported cases where leaf stomata penetration was clearly visible (data not shown).

The cover crops present in pear orchards were also infected by *S. vesicarium* and *Alternaria* spp. In the case of *Lolium* spp. the infections were observed on leaves and stems. Although green plant parts did not produce spores, as the plants dry out the infected areas started to produce *S. vesicarium* and *Alternaria* spp. conidia. Rain or dew stimulated the sporulation in these species (Sobreiro et al., 2003). *S. vesicarium* was also reported infecting several cover crops in pear orchards but not *Alternaria* spp. (Francisco, 2021).

Figure 1 – Infected pear leaf caused by *Stemphylium vesicarium* ascospore (A). Initial infection stage of *Alternaria* sp. in pear leaf (B). Sporulating *Alternaria alternata* in pear leaf lesion (C). *Alternaria* sp. pear leaf infection symptoms, red halo absent (D) or present (E). *S. vesicarium* pear leaf infection symptoms, red halo absent (F) or present (G). Pear dormant bud infected by *Alternaria arborescens* with mycelia and spores visible (H, I). *S. vesicarium* pseudothecia visible in a winter leaf disk collected from a pear orchard floor (J). Initial stage of a *S. vesicarium* formation with hyphae connected to a visible ascospore (K). Pear calyx infected by *A. alternata* with visible spores (L). Pear flower stigma and style infected by *A. arborescens* with visible spores (M). *A. alternata* sporulation visible on pear fruit collected at harvest (N). *S. vesicarium* on pear fruit observed at late harvest (O). *A. arborescens* abundant sporulation (P) and *S. vesicarium* high density sporulation on *Ficus carica* fruit in May (Q). Aspect of *S. vesicarium* spores growing on a *Solanum lycopersicum* fruit (R).



3.2 PEAR LITTER LEAVES

We confirmed that *S. vesicarium* overwinters as pseudothecia inside dead pear leaves at soil surface (Figure 1 J-K). This is the sexual stage of *S. vesicarium*, providing the fungus with the ability to adapt itself to the environment. One important source of *S. vesicarium* for Spring infection seems to be ascospores released by dead pear leaves. In this study we found many *S. vesicarium* ascospores landed over pear leaves and fruits. The ascospore dose over these organs was eight to 25 times higher than the number of *S. vesicarium* recorded conidia on the same organs. We hypothesise that *S. vesicarium* can also overwinter in other cover crops debris, but this claim needs confirmation.

The sexual stage of *A. alternata* and *A. arborescens* is unknown, but it is commonly visible inside cereal crops debris in the case of *A. infectoria* (Perelló and Sisterna, 2008).

3.3 FLOWER INFECTIONS

The flower infections linked to BSD occurred in the pear calyx, stigma, style, and filament but not in the anther. *S. vesicarium* just infected the flower calyx whereas *Alternaria* spp. infections were observed on the calyx, stigma, style (Figure 1 L-M) and filament. *S. vesicarium* lesions on flower calyx sporulated very rarely and accounted for less than 1% of the total flowers with visible infection symptoms. *Alternaria* spp. sporulation was frequent in the flower calyx, pistil, and filaments. In this study 26% of the pear flowers sampled exhibited infection symptoms. From the ones with symptoms, 0.6% were clearly *S. vesicarium*, 91.3% were *Alternaria* spp. and the remaining were unidentifiable.

The infection of cover crop flowers was observed in the plants of *Asteraceae* family, namely the Common sowthistle (*Sonchus oleraceus*) and the Bristly oxtongue (*Helminthotheca echioides*). The *Asteraceae* capitulum of these species was heavily infected by both *S. vesicarium* and *Alternaria* spp. and abundant conidial production was observed (data not shown).

3.4 FRUIT INFECTIONS

Several studies were conducted in Portugal on the pathogenicity and severity of *S. vesicarium* on pear (Dias, 2020; Francisco, 2021; Santos, 2019) and fungus identification on pome fruits (Silva, 2011).

Before June, the pear infections were more common in the area around the calyx. We observed that most spores were concentrated around this spot. After June, the infections were also common in the side of pear fruit facing the external and more

illuminated sides of the trees. We observed the infections in apparently intact fruit epidermis and more often through the lenticels. The lesion initiated as less than 1 mm diameter brown spot, with or without red halo, and progressed slowly to reach as much as 25 mm diameter at harvest. This is in agreement with other studies performed in Portugal (Diogo et al., 2017; Sobreiro et al., 2003).

In the case of *S. vesicarium*, the lesions generally did not produce any spores, as previously mentioned for leaves. On the other hand, fruits with *Alternaria* spp. sporulating lesions were more likely to occur, especially on wounded pears.

At harvest time, the infected pears exhibited early maturation, turning yellow and falling to the ground about one week before harvest. The infection stimulated ethylene and CO₂ release in the infected fruits, which explains this behaviour (Almeida, 2015). As pear fruits turn yellow, *S. vesicarium* and *Alternaria* spp. infections produced mycelia with abundant sporulation. In some cases, the sporulation was observed only on the fallen pears. It was quite common the observation of *S. vesicarium* and *Alternaria* spp. on the same infected pear, individually or sharing the same lesion. The *S. vesicarium* sexual stage was absent in fallen fruits.

The observation of fig fruits exhibited strong sporulation for *S. vesicarium* and *Alternaria* spp. on lesions over 5 mm diameter (Figure 1 P-Q). The sporulation period was observed between late April and the end of July. The infected fig fruits remained on trees for weeks with visible sporulation before falling to the ground. Some infected fig fruits dried out and remained attached to the trees continuing to sporulate and resembling dark mummified fruits.

The infections of *S. vesicarium* and *Alternaria* spp. were also observed on bell pepper and tomato fruits. As soon as the fruit lesions reached 5 mm diameter, they sporulated very densely (data not shown).

3.5 FLOWER BUD INFECTIONS

In wintertime (January and February) we observed many pear buds with internal tissues shrivelled and covered with dark areas. Inside many buds it was not possible to identify the cause of those symptoms. However, fungus mycelia were visible in 19% of the buds (average of the three years) (Figure H-I). The mycelia were also present within the bud scales. The *S. vesicarium* sporulation was never observed inside or outside the bud scales neither its pseudothecia. The *Alternaria* spp. was detected sporulating over the internal or external bud scales. Many flower buds with symptoms aborted or were not able

to develop normal flowers in the Spring. Others presented far less flowers than normal, one to three per bud instead of the average seven. Regarding blossom blast of pear buds, the bacteria *Pseudomonas syringae* is the pathogen normally associated (Whitesides and Spotts, 1991). We observed that *A. alternata* and *A. arborescens* produced abundant sporulation in pear buds during winter. Each spring those spores were an important part of primary infections on pear tree, being responsible for important bud destruction. Those buds presented loose scales that fell easily. Some studies also suggested the *Alternaria* spp. as cause of blossom blast in pear (Wenneker et al., 2019).

3.6 AIR-BLAST SPRAYERS

The air-blast sprayers blow a strong air flow, sucking air from the rear and forcing the stream along with liquid pesticide, injected by the nozzles towards the pear canopy (Figure 2 A). In this study we measured the spore dose before (Figure 2 B) and after spray treatments (Figure 2 C). We observed 10 to 50 times more spores of *Alternaria* spp. and *S. vesicarium* deposited on pear fruit surface after the spray treatments. The *Alternaria* spp. spores were the most frequent (Figure 2 C). This means that air-blast sprayers were responsible for blowing up the spores when operating. The effect of this spore dose increment surely has a strong impact on future disease epidemic development.

Figure 2 – Air-blast sprayer commonly used to spray pear orchards in Portugal (A). *Alternaria* sp. conidia on pear fruit cuticula sampled before the spray treatment (B). Aspect of a spray droplet on a pear fruit surface with *Alternaria* spp. spores and a single *Stemphylium vesicarium* conidium, after a spray treatment (C).



3.7 BROWN SPOT DISEASE PATHOSYSTEM FOR PEAR ORCHARDS

One feasible way to represent the BSD pathosystem is shown in Figure 3. The BSD primary infections in Spring are caused by *S. vesicarium* ascospores released from the orchard floor, or conidia originated from fig trees in the orchard's neighbourhoods and dragged by the wind into the pear host. *S. vesicarium* ascospore release rate depends on light intercepted and water from dew or rain (Sobreiro et al., 2003). This event leads to Type A infections, where the leaves show an infection pattern with scattered spots, one

or two per leaf. This pattern of infection is explained by the longest pathway of the spores in the atmosphere, before randomly landing on the susceptible tissues.

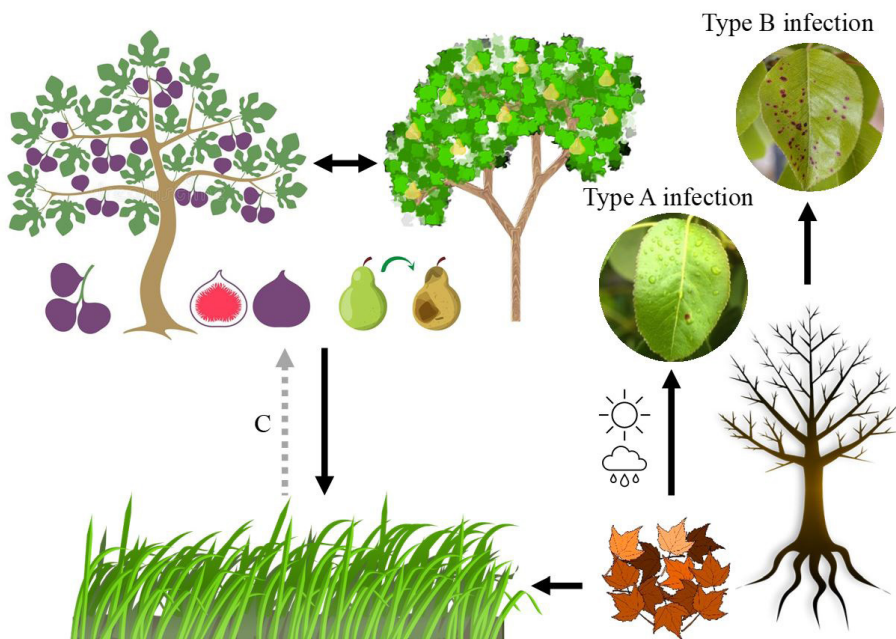
The Type B primary infection pattern happens when *Alternaria* spp. conidia originated on pear buds infect the nearby leaves. The infection source is remarkably close to the susceptible tissues, just centimetres apart, and the number of conidia released by lesion is extremely high. In this case, every pear leaf observed at the beginning of the season is heavily infected with five or more spots (Figure 3).

In Mediterranean climate, the orchard cover crops are fully established in October, as the rainfall begins to increase, and dry out in May or early June, in the absence of rain. In this scenario, deciduous species like pear, fig or vineyards are the most probable source of spores for cover crop *Alternaria* spp. infections. Dead leaves of pear trees discharge actively the ascospores at daylight into the atmosphere, providing the inoculum for *S. vesicarium* infection of perennial hosts or cover crops.

As *S. vesicarium* and *Alternaria* spp. spores are very heavy (falling about 3 m every 10 minutes in still air) (Woo et al., 2018) they tend to settle down from the atmosphere very quickly and stay over the weeds or trapped between them. We observed that, in this case, man-made actions like spraying with air-blast sprayers could blow large amounts of those spores to the pear canopies (Figure 3).

It seems very unlikely that sporulating pear fruits fallen on the orchard's floor contribute to the disease epidemiology, due to the previous arguments (heavy spores, non-susceptibility of dry cover crops and the absence of spray treatments after harvest). This claim is supported by the small number of *S. vesicarium* conidia observed on the fruits before the spray treatments, and its increment afterwards. It has been reported that the removal of fruits and debris from pear orchard's floor presents a low impact in the number of *S. vesicarium* spores collected weekly on microscope glass slides, and thus in the disease epidemic progression (Constantino, 2019). Nevertheless, in other trial the mechanical removal of the orchard' fruits and debris after harvest influenced positively the spore deposition over the pear canopies (Afonso, 2021).

Figure 3 – Pathosystem representation of the Brown Spot Disease. Primary infection sources are the ascospores of *Stemphylium vesicarium* from the dead leaves on the pear orchards floor (infection type A) or conidia from *Alternaria* spp. overwintering mycelia in pear buds (infection type B). Other source of inoculum could be the fig trees in the orchard's vicinity for *Alternaria* spp. or *S. vesicarium*. Cover crops are most likely to be infected by spores from perennial or from dead debris on orchard floor. The anthropomorphic actions like use of air-blast sprayers could lead to the high spore dose on fruits surface from multiple inoculum sources (C).



4 CONCLUSION

In summary the main insights into Brown Spot Disease in agroecosystems are:

- *Stemphylium vesicarium* and *Alternaria* spp. exhibit two types of similar symptoms on pear leaves or fruits: brown spots with or without red halo. The symptoms cannot be interpreted as the signs of those pathogens. Therefore, the sample judging by naked eye can be misleading.
- *S. vesicarium* overwinters as pseudothecia on dead pear leaves on the orchard floor that actively discharge ascospores during daylight when wetted by rain or dew. *S. vesicarium* pseudothecia seem not to develop in pear buds.
- *A. alternata* and *A. arborescens* sexual stage is unknown and does not produce ascospores. Mycelium of *Alternaria* spp. sporulate in pear flower buds, causing blossom blast and contributes significantly to primary infections of BSD.
- *Alternaria* spp. conidia are more frequent on pear leaf blades or fruit surface than *S. vesicarium* ascospores and conidia. In the same tissues, *S. vesicarium* ascospores are more frequent than conidia.

- Pear flowers are infected with *S. vesicarium* and *Alternaria* spp. *S. vesicarium* conidia are rarely produced in pear flowers whereas abundant conidia of *Alternaria* spp. are produced in all pear flower parts, excluding the anthers.
- Fruit lenticels are important openings for *S. vesicarium* and *Alternaria* spp. infection.
- The green tissues of cover crops infected by BSD do not sporulate. The *Asteraceae* capitulum produces abundant *S. vesicarium* and *Alternaria* spp. conidia, late in Spring, when the cover crops dry out.
- The use of herbicides or mowing grass below 10 cm height is beneficial to *S. vesicarium* and *Alternaria* spp. sporulation, since dead cover crops tissues, when exposed to sunlight, provide large amounts for fungi growth.
- The air-blast sprayers increase the number of spores of *S. vesicarium* and *Alternaria* spp. that land over the pear canopies, 10 to 50 times per spraying.
- Brown Spot Disease is highly influenced by anthropomorphic actions and climate changes in ecosystems. A global approach is needed to reestablish the ecosystem equilibrium to manage this disease.

5 FUNDING

This work received no external funding.

6 CONFLICTS OF INTEREST

The author declares no conflict of interest.

REFERENCES

Afonso, C., 2021. **Reduzir o inóculo de estenfiliose** [WWW Document]. URL https://www.flrevista.pt/wp-content/uploads/2021/10/FLF-223_grande-plano_pera-e-maca_parte-10.pdf (accessed 6.6.23).

Almeida, D., 2015. **Pós-colheita da pera Rocha em ano de estenfiliose (2015/2016)** [WWW Document]. URL https://www.isa.ulisboa.pt/files/fl/pub/Pos-colheita_da_pera_Rocha_em_ano_de_estenfiliose.pdf (accessed 7.6.23).

Blancard, D., Allard, E., Brest, P., 1989. **La Stemphyliose du poirier ou «macules brunes»**. Phytoma (Paris) 37–39.

Constantino, L., 2019. **Controlo da Estenfiliose Ensaio de Campo em Alcobaça**. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

Dias, D., 2020. **Monitorização da estenfiliose em ensaios de campo da FRUTOESTE**, CRL. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

- Diogo, E., Sánchez, C., Leão, M., Sousa, R., 2017. **A Estenfiliose da Pereira Rocha em Portugal.** *Agrotec* 46–48.
- Francisco, C., 2021. **Doença das manchas castanhas da pereira “Rocha”: contributo para a proteção.** Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Henriques, B., 2018. **Contribuição para o estudo de fungos do género *Alternaria* em solanáceas no Ribatejo e Oeste.** Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Hubert Głós, H. Bryk, Monika Michalecka, J. Puławska, 2023. **First report of *Stemphylium vesicarium*, a new pathogen causing brown spot of pear in Poland.** *Journal of plant pathology.* <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01365-6>
- Köhl, J., Haas, B.H.G., Kastelein, P., Rossi, V., Waalwijk, C., 2009. **Quantitative detection of pear-pathogenic *Stemphylium vesicarium* in orchards.** *Phytopathology* 99, 1377–1386. <https://doi.org/10.1094/phyto-99-12-1377>
- Köhl, J., Kastelein, P., Haas, L.G., Balkhoven, H., Wubben, J., Veenhuizen, P., 2013. 291073.pdf [WWW Document]. **Risicovoorspelling van zwartvruchtrot in peer.** URL <https://edepot.wur.nl/291073> (accessed 6.14.23).
- Kokaeva, L.Y., Belosokhov, A.F., Doeva, L.Y., Skolotneva, E.S., Elansky, S.N., 2018. **Distribution of *Alternaria* species on blighted potato and tomato leaves in Russia.** *J Plant Dis Prot* 125, 205–212. <https://doi.org/10.1007/s41348-017-0135-3>
- Llorente, I., Montesinos, E., 2006. **Brown Spot of Pear: An Emerging Disease of Economic Importance in Europe.** *Plant Disease* 90, 1368–1375. <https://doi.org/10.1094/pd-90-1368>
- Perelló, A., Sisterna, M., 2008. **Formation of *Lewia infectoria*, the teleomorph of *Alternaria infectoria*, on wheat in Argentina.** *Australasian Plant Pathology* 37, 589–591. <https://doi.org/10.1071/AP08060>
- Santos, R.R., 2019. **Incidência e severidade de estenfiliose em pereira ‘Rocha’ no Oeste e avaliação da eficácia biológica de fungicidas.** Universidade de Lisboa, Lisboa.
- Silva, S., 2011. **Caracterização de fungos do género *Stemphylium* associados a pomóideas em Portugal.** Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Sobreiro, J., Neto, C., Teves, M., 2003. **Visão global da doença da estenfiliose da pereira (*Pleospora allii*).** Presented at the 6º Encontro nacional de Proteção Integrada, ESA, Castelo Branco.
- Temperini, C.V., Tudela, M.A.A., Gimenez, G.N., Di Masi, S.N., Pardo, A.G., Pose, G.N., 2022. **Brown spot of pear, an emerging disease in Argentina: identification and pathogenicity characterization of Argentinean *Stemphylium vesicarium* isolates.** *European Journal of Plant Pathology* 163, 529–544.
- Tralamazza, S.M., Piacentini, K.C., Iwase, C.H.T., Rocha, L. de O., 2018. **Toxigenic *Alternaria* species: impact in cereals worldwide. Current Opinion in Food Science, Food Engineering & Processing part 1 * Food Engineering & Processing part 2** * *Food Mycology* 23, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.002>
- Van Laer, S., Vorstermans, B., Hauke, K., Creemers, P. 2006. **Brown spot control on pear: infection models versus the inoculum pressure in Belgium.** *Communications in agricultural and applied biological sciences* 71, 839–847.

Wenneker, M., Pham, K., Woudenberg, J.H.C., Thomma, B., 2019. **Identification of *Alternaria* spp. as causal agent of dead flower buds disease of pear (*Pyrus communis*) in the Netherlands and methods for disease control.** European Journal of Plant Pathology 155. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01827-7>

Whitesides, S.K., Spotts, R.A., 1991. **Induction of pear blossom blast caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.** Plant Pathology 40, 118–127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1991.tb02300.x>

Woo, C., An, C., Xu, S., Yi, S.-M., Yamamoto, N., 2018. **Taxonomic diversity of fungi deposited from the atmosphere.** ISME J 12, 2051–2060. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0160-7>

Woudenberg, J.H.C., 2015. **Restyling *Alternaria*.** Wageningen University, Wageningen.

Woudenberg, J.H.C., Seidl, M.F., Groenewald, J.Z., de Vries, M., Stielow, J.B., Thomma, B.P.H.J., Crous, P.W., 2015. ***Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes?** Stud Mycol 82, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.07.001>

CAPÍTULO 11

AVANCES EN EL RESCATE Y CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS GENÉTICOS DE VAINILLA EN MÉXICO

Data de submissão: 27/06/2024

Data de aceite: 11/07/2024

Juan Hernández Hernández

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)
Campo Experimental Ixtacuaco
Tlapacoyan, Veracruz, México

Esmeralda J. Cruz Gutiérrez

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)
Centro Nacional de Recursos Genéticos
Tepatitlán, Jalisco, México

RESUMEN: La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks) es un producto de importancia mundial, la cual es utilizada como saborizante y aromatizante en las industrias de alimentos, bebidas, perfumes y cosméticos. El 95% de la producción mundial proviene de *V. planifolia*, debido a la preferencia de las industrias por su alto contenido de vainillina. Esta especie y otras no comerciales como *V. insignis*, *V. cribbiana*, *V. inodora*, tienen su centro de origen en el área de Mesoamérica, lugar donde se puede encontrar la mayor biodiversidad. Sin embargo, estas especies están en peligro de extinción a causa de la destrucción de su hábitat natural, por el cambio climático, y los daños por plagas y enfermedades, entre

otros factores. Considerando esta situación; así como el valor histórico, económico y cultural que tiene este cultivo en México, en el año 2017, se inició este proyecto del banco de germoplasma de vainilla en el Campo Experimental Ixtacuaco (CEIXTA), Tlapacoyan, Veracruz, el cual tiene como objetivo primordial rescatar y preservar las especies mexicanas de vainilla para evitar su extinción, y a futuro conocer si alguna de ellas presenta atributos importantes en productividad, calidad de fruto, perfil aromático y tolerancia a factores bióticos y abióticos. El banco está conformado por 119 colectas con sus datos de pasaporte (lugar de colecta, coordenadas geográficas, especie etc.) pertenecientes a las especies, *V. planifolia*, *V. pompona*, *V. insignis*, *V. cribbiana* y *V. odorata*, recolectadas durante los años 2017, 2018 y 2019, en parcelas de productores, de los estados de Veracruz, Puebla y Oaxaca. Además, de la conservación en campo, se ha iniciado de forma simultánea la conservación *in vitro* (*ex situ*), en el laboratorio del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del INIFAP, ubicado en Tepatitlán, Jalisco. Las accesiones del banco de germoplasma, además de salvaguardarse para evitar su extinción, en el futuro servirán de base para programas de mejoramiento genético, investigación científica, así como fuente primaria de material propagativo de alta calidad fitosanitaria en beneficio de los productores.

PALABRAS CLAVE: *Vanilla* spp. Preservación. Germoplasma. Biodiversidad.

1 INTRODUCCIÓN

La vainilla (*V. planifolia* Jacks ex Andrews), de cuyos frutos procesados se obtiene la vainillina y cientos de compuestos, son usados como un intensificador de sabor en la industria de alimentos, helados, perfumería, farmacéutica, tabacalera y licores, siendo así la más popular en todo el mundo. Este producto, en el mercado internacional, puede alcanzar precios entre 300 y 500 dólares por kilogramo de vainas de vainilla beneficiada. El 95 % de la producción mundial de vainilla proviene de *V. planifolia* (Bory *et al.*, 2008; Santillán *et al.*, 2019). No obstante, esta especie, así como otras no cultivadas, están amenazadas o en peligro de extinción (Soto, 2006; Schlüter *et al.*, 2007; Lubinsky *et al.*, 2008; Grisoni *et al.*, 2014), a causa de: la destrucción de su hábitat natural, cambio climático, por plagas y enfermedades, a que el productor ha ido seleccionando y conservando sólo la vainilla de interés económico, entre otros factores (Soto, 2006; Soto y Dressler, 2010). Asimismo, en *V. planifolia*, de acuerdo con estudios previos (Soto y Dressler, 2010; Villanueva *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2019), se menciona que la diversidad genética es muy reducida, debido a que el cultivo siempre se ha propagado de manera asexual por esquejes que se obtienen de las mismas plantaciones comerciales y la polinización se hace manualmente para la obtención de una cantidad adecuada de frutos. Sin embargo, existe la polinización cruzada, aunque en pequeño porcentaje (1 %) de manera natural y accidental realizada por los insectos (Soto, 1999; Hernández *et al.*, 2010), que han estado contribuyendo en la variabilidad genética de esta especie, esto da la posibilidad de encontrar cuando menos un genotipo con mejores atributos o al menos determinar los morfotipos dentro de cada especie. Por ejemplo, en México, existen algunos tipos dentro de esta especie comercial conocidas como “rayada” (mutante), “oreja de burro” (abortiva), “polen duro”, etc. (Castillo y Engleman, 1993; Hernández, *et al.*, 2010), lo cual indica que si puede existir variabilidad genética y quizá otros morfotipos que no se han identificado todavía. En las especies silvestres (*V. pompona*, *V. insignis*, *V. odorata* y *V. cribbiana*) existen diferencias claras en su fenotipo y resistencia o tolerancia a plagas, enfermedades y sequía, que pueden ser fuentes de mejoramiento genético, de ahí la importancia de resguardarlos en un banco de germoplasma a nivel de campo (CEIXTA) y en el laboratorio de cultivo *in vitro* perteneciente al CNRG-INIFAP.

A la fecha, en nuestro país, no se han generado o identificado genotipos con alguna característica sobresaliente, por ejemplo, en resistencia a algún factor biótico o abiótico, en aroma diferente, entre otros atributos de interés agroindustrial, que superen a la que actualmente se cultiva (*V. planifolia*). Considerando esta situación, así como el valor genético, histórico, económico y cultural que tiene la vainilla en México, en 2017

se estableció un banco de germoplasma de vainilla *ex situ* con el objetivo primordial de rescatar, conservar y caracterizar las especies de México para evitar su extinción, y a futuro determinar si presentan atributos interesantes en productividad, calidad de fruto, perfil aromático o tolerancia a factores bióticos y abióticos.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

El banco de germoplasma de vainilla se ubica en el CEIXTA-INIFAP (20°18'37" N y 96°59'29" W, 92 msnm), km 4.5, carretera Martínez de la Torre-Tlapacoyan, Ver. El CEIXTA se encuentra ubicado estratégicamente en la principal área productora de la vainilla, conocida como Totonacapan (Veracruz y Puebla), por lo tanto, el INIFAP, representa un importante centro de investigación para el resguardo de la diversidad genética del género *Vanilla* spp, en México. Las colectas de vainilla se realizaron en los principales municipios productores de vainilla de los estados de Veracruz, (Papantla, Gutiérrez Zamora, Tecolutla y Tihuatlán), Puebla (San José Acateno y Pantepec) y Oaxaca (Valle Nacional y Usila). Las colectas se efectuaron mediante recorridos en parcelas de los productores y se cortaron de uno a dos tramos de tallo conocidos como esquejes (material de propagación) de 1 m de longitud en cada sitio visitado. Como criterio de colecta, se seleccionaron los esquejes vigorosos de 6 a 10 mm de diámetro y físicamente sanos, es decir sin daños visibles de plagas y enfermedades provenientes de plantas madre productivas. Se utilizó un GPS para la determinación de las coordenadas geográficas de los sitios de colecta y se anotaron los datos (pasaporte), como fecha de colecta, localidad, especie de vainilla y nombre del productor. Los esquejes colectados, se trasladaron al CEIXTA para su siembra en bolsas de plástico con dimensiones de 50 x 50 x 50 cm (largo, ancho y altura, respectivamente). El sustrato que se utilizó fue una mezcla de lombricomposta con Cosmopeat®, en la proporción de 2:1. Una vez enraizados y con brote vegetativo, se plantaron en su lugar definitivo en árboles tutores vivos (caoba, cedro y roble). También, en 2021 se llevaron siete materiales vegetativos (esquejes) al CNRG para su conservación *in vitro* de las especies de *V. planifolia*, *V. insignis*, *V. pompona* y *V. cribbiana*. Los esquejes, se plantaron en macetas y se colocaron dentro de un invernadero para su desarrollo y una vez que emitieron brotes nuevos, se tomaron los meristemas apicales (explantes) para su cultivo *in vitro*, multiplicación y conservación, bajo la modalidad de crecimiento mínimo. Los explantes se sembraron en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962) al 100% con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 9 g L⁻¹ de agar, con un pH de 5.7.

3 DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA

Se utilizó como guía los descriptores determinados por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV, 2014) y se consideraron las características de las hojas, flor y fruto de las diferentes especies representativas de la diversidad genética de vainilla. Se registraron las variables color, forma y tamaño de la flor, que es el órgano que menos cambia con el ambiente y, por lo tanto, el diferenciador entre una especie o variedad y otra. También se realizaron observaciones con respecto a tolerancia de plagas, enfermedades y sequía, su época de floración, calidad de fruto, entre otros atributos. Se tomaron fotografías de las características distintivas de cada especie para dar a conocer a los interesados en el cultivo. La descripción cuantitativa se hará una vez que se tengan más cantidad de individuos por genotipo y cuando se establezcan en condiciones homogéneas. Para la identificación de las especies se utilizó como guía las características descritas por Soto y Dressler (2010).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se han logrado conservar 119 materiales genéticos colectados entre los años 2017 y 2019, correspondiente a las especies de *V. planifolia*, *V. pompona*, *V. insignis*, *V. cribbiana* y *V. odorata* (Cuadro 1). Estos materiales están siendo resguardados y conservados en condiciones de campo en el banco de germoplasma del CEIXTA – INIFAP.

Cuadro 1. No. de colectas/accesiones del banco de germoplasma de vainilla del CEIXTA-INIFAP.

Especie	Número de colectas
<i>Vanilla planifolia</i> (Jacks)	78
<i>Vanilla pompona</i> (Shiede)	26
<i>Vanilla odorata</i> (C. Presl)	7
<i>Vanilla insignis</i> (Ames)	5
<i>Vanilla cribbiana</i>	3
Total	119

5 DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES DE VAINILLA

Vanilla planifolia. Es la especie cultivada, conocida como “mansa” o “fina” por los productores de México. Se caracteriza por tener hojas carnosas, elípticas, lanceoladas y de color verde. Las flores son de color verde amarillento y los frutos presentan tres costados cóncavos en forma cilíndrica, de color verde antes de su maduración. Esta especie es susceptible a las principales plagas y enfermedades (Figura 1).

Figura 1. Flores de *V. planifolia* “mansa o fina”.



Vanilla pompona. Esta especie conocida como “platanillo” o “pompona” tiene un desarrollo exuberante, tallo grueso, hojas gruesas y grandes, flor grande y muy llamativa por su color amarillo, el fruto es triangular y succulento, parecido a un plátano pequeño. Por su vigor, resiste los daños causados por *Fusarium oxysporum* fs. *vanillae* y a la sequía (Figura 2).

Figura 2. Flor de *V. pompona*.



Vanilla odorata. Esta especie de vainilla se encuentra en forma silvestre en la selva perennifolia o en vegetación secundaria, en los municipios de Tuxtepec y Usila, Oaxaca; así como en los estados de Tabasco y Chiapas. Es una planta poco vigorosa, se caracteriza por sus hojas angostas y alargadas, tiene de dos a tres floraciones por año, frutos delgados, alargados y aromáticos. La planta tiene un aspecto similar a la *V. tahitensis* y no es atacada por la principal plaga conocida como chinche roja (*Thentecoris confusus*) (Figura 3).

Figura 3. Flores de *V. odorata*.



Vanilla insignis. Conocida en México como vainilla “cimarrona”, su planta se caracteriza por dos acanaladuras a lo largo del tallo, el que además es rugoso, produce hojas pequeñas y frutos gruesos pero cortos (menores de 10 cm en longitud) e indehiscentes, y al parecer las vainas no son aromáticas (Figura 4).

Figura 4. Flor de *V. insignis*.



Vanilla cribbiana. Es una planta que se distingue por tener hojas delgadas, tallo resistente con entre nudos cortos, florece generalmente en el mes de julio, la flor es de color amarillo intenso con aroma a cítricos. Los frutos son gruesos y cortos, pero no es aromático. No es atacada por la chinche roja y muestra resistencia a la pudrición de raíz y tallo, causado por *F. oxysporum* fs. *Vanillae* (Figura 5).

Figura 5. Flores de *V. cribbiana*.

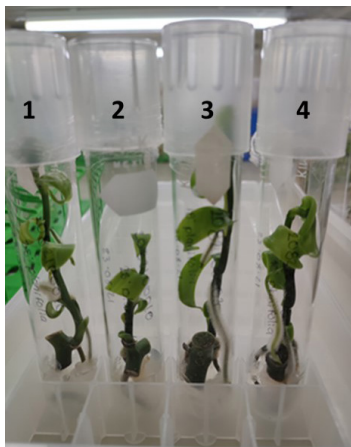


Conservación *in vitro*. Se sembraron siete accesiones de vainilla para su establecimiento en condiciones *in vitro* (Cuadro 2), de los cuales, solo tres de ellas, lograron establecerse para su multiplicación y conservación en crecimiento mínimo, que fueron los siguientes: *V. planifolia* “rayada”, *V. planifolia* “oreja de burro” y *V. planifolia* “mansa” (Figura 6). Las restantes se contaminaron y se tendrán que sembrar nuevamente.

Cuadro 2. Colectas establecidas en condiciones *in vitro* en el CNRG, durante 2021.

No. clave de colecta	Especie y morfotipo de vainilla
01	<i>V. pompona</i> típica
18	<i>V. planifolia</i> “mansa”
25	<i>V. planifolia</i> “rayada”
90	<i>V. planifolia</i> “mansa”
28	<i>V. planifolia</i> “polen duro”
73	<i>V. planifolia</i> “mansa”
40	<i>V. planifolia</i> “oreja de burro”

Figura 6. Plántulas de vainilla *in vitro*. 1 y 2) *Vanilla planifolia* “rayada”. 3) *Vanilla planifolia* “mansa”. 4) *Vanilla planifolia* “oreja de burro”.



6 CONCLUSIONES

1. Se han logrado conservar en condiciones de campo 78 materiales genéticos colectados entre los años 2017 y 2019 correspondiente a *V. planifolia* y 41 de otras especies no cultivadas como son *V. pompona*, *V. insignis*, *V. odorata* y *V. cribbiana*. Pero solo tres colectas de *V. planifolia* se han logrado conservar *ex situ (in vitro)* en la modalidad de crecimiento mínimo.
2. Se sugiere hacer la caracterización molecular de las accesiones de vainilla para conocer la diversidad genética. Con el análisis genético molecular se irá agrupando los materiales iguales y solo se conservarán en el banco de germoplasma los genotipos identificados como diferentes, lo cual reducirá el costo de mantenimiento al reducir el número de accesiones.
3. Con base a lo observado en campo, la *V. pompona* presenta mayor tolerancia a los daños por *Fusarium oxysporum* y a la sequía; mientras que *V. cribbiana* no fue atacada por la principal plaga (chinche roja) ni por enfermedades, lo cual, pueden ser fuentes de mejoramiento genético. Falta realizar los estudios correspondientes para dar el soporte científico.

LITERATURA CITADA

Bory, S., M. Grisoni., M.F. Duval and P. Besse. 2008. Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 551-571.

Castillo, M.R. y E.M. Engleman. 1993. Caracterización de dos tipos de *Vanilla planifolia*. *Acta Bot. Mex.* 25: 49-59.

Grisoni, M., R. Gigant., K. Jade., J.B. Dijoux and P. Besse. 2014. Conservation and characterization of biological resources of vanilla: ten years of patience and surprises. P. 177-178. In: Araya, F.C; Cordero, S.R; Paniagua V, A; y Azofeifa, B. JB (eds.). I seminario Internacional de Vainilla. Promoviendo la investigación, la extensión y la producción de vainilla en Mesoamerica. 1 ed. INSEFOR, Universidad Nacional, Heredia Costa Rica.

Hernández, H. J., S. Sánchez M., E. Curti D. y H. Larios R. 2010. La producción de vainilla en México. Folleto técnico núm. 25. INIFAP-CIRGOC. Campo Experimental Ixtacuaco-CIRGOC-INIFAP. 198 P.

Hu, Y., F.R. Marcio, Jr., A. Bombarely., M. Brym., E. Basil and AH. Chambers. 2019. Genomics-based diversity analysis of *Vanilla* species using a *Vanilla planifolia* draft genome and Genotyping-By – Sequencing. *Scientific Reports* 9:3416.

Lubinsky, P., S. Bory., J. Hernández H., K. Seung Ch. y A. Gómez P. 2008. Origins and Dispersal of Cultivated Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks, Orchidaceae). *Economic Botany* 62 (2):127-138.

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

Santillán, F. A., M. Trejo C., A. Martínez S., A. Martínez L., N. Vasquez B. y L. Mejia S. 2019. Production potencial of *Vanilla planifolia* Jacks in Totonacapan, México, using geographic techniques. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Vol. 10 (4).

Soto, A. M.A. 1999. Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Informe final SNIB-CONABIO del proyecto J101. Instituto Chinoín AC. México, D.F. 106 p.

Soto, A. M.A. y R.L. Dressler. 2010. A revision of the mexican and central american species of vanilla plumier ex miller with a characterization of their its region of the nuclear ribosomal DNA. LANKESTERIANA 9(3): 285-354. 2010.

Soto, A. M.A. 2006. La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. Biodiversitas. Boletín bimestral (mayo-junio) de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Núm. 66, 9 p.

Schlüter, P.M., M.A. Soto A. and S.A. Harris. 2007. Genetic variation in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). Economic botany 61 (4): 328-336.

Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV). 2014. Ginebra, Suiza. <http://www.upov.int/edocs/tgdocs/es/tg303.pdf>. [Consultado el 25 de junio, 2022]

Villanueva, V. S., M. Hernández A., G.C. Fernández C., A. Dorantes E., R. Dzibi G. y J. Martínez C. 2017. Wild *Vanilla planifolia* and its relatives in the Mexican Yucatán Peninsula: Systematic analyses with ISRR and ITS. Botanical Sciences. 95(2): 169-187.

CAPÍTULO 12

THE ROLE OF BENTHIC MACROFAUNA IN HEADWATER STREAMS, CHAPADA DOS VEADEIROS, CENTRAL BRAZIL

Data de submissão: 31/05/2024

Data de aceite: 11/06/2024

Maria Júlia Martins Silva

Professora Associada da
Universidade de Brasília
Diretora do Centro de
Estudos do Cerrado da
Chapada dos Veadeiros (UnB Cerrado)
Mestre e Doutora em Zoologia no
Museu Nacional do Rio de Janeiro e na
Universidade de São Paulo
Centro UnB Cerrado e Departamento de
Zoologia; Universidade de Brasília
<https://orcid.org/0000-0003-2638-7306>

Claudia Padovesi Fonseca

Professora Titular da
Universidade de Brasília (UnB)
Líder do Núcleo de Estudos
Limnológicos (NEL) – CNPq
Mestre e Doutora em Limnologia pela
Universidade de São Paulo (USP)
Realizou Pós-Doutorado na
Universidade de Paris Pierre e
Marie Curie, na França e na
Universidade de Granada, na Espanha
Departamento de Ecologia
Instituto de Biologia
Universidade de Brasília – UnB
Campus Universitário Darcy Ribeiro
Brasília, DF CEP 70910-900, Brazil
<https://orcid.org/0000-0001-7915-3496>

ABSTRACT: The study was conducted in headwater streams located in Chapada dos Veadeiros, Goiás, Brazil: São Bartolomeu and Couros streams. Benthic macroinvertebrates were collected in 2011 and 2012, during rainy (October to December) and dry (May and July) seasons. Eight orders of benthic macrofauna were recorded in both streams. Odonata had higher abundances: rio São Bartolomeu ranged from 42.7 to 19.5%; rio dos Couros from 45.4 to 28.3%. Coleoptera was representative in the rio São Bartolomeu along the study (28.1%, dry/2011; 14.9%, rainy/2011; 11.3%, dry/2012; 15.6%, rainy/2012). Diptera reached 24.2% in the rio dos Couros, dry/2011; and Hemiptera had 32.5% in the rio dos Couros, dry/2012. In relation to the EPT triad (Ephemeroptera-Plecoptera-Trichoptera), Plecoptera maintained reduced abundances, with the highest value obtained in the rio São Bartolomeu-dry/2012 (16.7%). High abundance of Ephemeroptera was obtained for both streams: in São Bartolomeu, it predominated in rainy seasons (31.3%, 2011; 35.1%, 2012); while in the Couros river this order was predominant in dry seasons (26.2%-2011; 30%-2012). Trichoptera was dominant in the dry/2012, rio São Bartolomeu (59%), and predominant in the dry/2011 in the rio dos Couros (21.2%). The two watercourses present relevant differences. Rio dos Couros has stony sediment and rugged terrain, with rapids and pools intercalated along its course. Rio São Bartolomeu has a sandier bed and a flatter basin. However, in

this first survey, the streams macrofauna were similar. Natural aspects were predominant in the benthic macrofauna structure of these streams. The vegetation cover of the basins is well preserved, in addition to riparian forests. As the two streams had a greater number of organisms and greater species richness in the dry season, it is presumed that the rainfall regime was the main factor in the composition of this biota.

KEYWORDS: Benthos. Biological indicators. Pristine waters. Altitude Cerrado.

O PAPEL DA MACROFAUNA BENTÔNICA EM RIACHOS DE CABECEIRA, CHAPADA DOS VEADEIROS, BRASIL CENTRAL

RESUMO: O estudo foi conduzido em riachos de cabeceiras situados na Chapada dos Veadeiros, Goiás, Brasil: rios São Bartolomeu e dos Couros. Os macroinvertebrados bentônicos foram coletados em 2011 e 2012, nas estações chuvosa (outubro a dezembro) e seca (maio e julho). Oito ordens da macrofauna bentônica foram registradas nos dois riachos. Odonata obteve maiores abundâncias: rio São Bartolomeu variou de 42,7 a 19,5%; rio dos Couros de 45,4 a 28,3%. Coleoptera foi representativa no rio São Bartolomeu ao longo do estudo (28,1%, seca/2011; 14,9%, chuva/2011; 11,3%, seca/2012; 15,6%, chuva/2012). Diptera atingiu 24,2% no rio dos Couros, seca de 2011; e Hemiptera ficou com 32,5% no rio dos Couros, seca de 2012. Em relação à tríade EPT (Ephemeroptera-Plecoptera-Trichoptera), Plecoptera manteve reduzidas abundâncias, com maior valor obtido no rio São Bartolomeu-seca de 2012 (16,7%). Abundância elevada de Ephemeroptera foi obtida para os dois riachos: no São Bartolomeu, predominou em períodos chuvosos (31,3%, 2011; 35,1%, 2012); ao passo que no rio dos Couros esta ordem foi predominante nas secas (26,2%-2011; 30%-2012). Trichoptera foi dominante na seca/2012, rio São Bartolomeu (59%), e predominante na seca/2011 no rio dos Couros (21,2%). Os dois cursos d'água apresentam diferenças relevantes. Rio dos Couros possui sedimento pedregoso e relevo acidentado, com corredeiras e piscinas intercaladas ao longo de seu curso. Rio São Bartolomeu possui leito mais arenoso e bacia mais plana. Entretanto, nesse primeiro levantamento, a macrofauna dos rios foi semelhante. Aspectos naturais foram preponderantes na estrutura da macrofauna bentônica destes rios. A cobertura vegetal das bacias está bem preservada, além das matas ripárias. Como houve para os dois rios maior número de organismos e maior riqueza de espécies na seca, é de se presumir que o regime de chuvas tenha sido o principal fator na composição dessa biota.

PALAVRAS-CHAVE: Bentos. Indicadores biológicos. Águas pristinas. Cerrado de altitude.

1 INTRODUCTION

Benthic species are associated with sediments in aquatic environments. They can colonize both, the margins and the bottom of rivers and lakes. Due to its sensitivity to variations in environmental quality, they are often used as biological indicators in water quality monitoring (SILVA-LEITE *et al.*, 2021). Therefore, environmental heterogeneity is an important element in the structure of benthic communities in aquatic ecosystems.

Benthic macroinvertebrates are composed of a wide variety of groups, which vary in size, type of food and habitat. They are essentially composed of mollusks and immature

stages of insects. They have a sedentary habit and a relatively long-life cycle, which makes them very representative spatially and temporally.

Because they occur in almost all types of freshwater environments, these organisms are very useful for efficient monitoring and evaluation of environmental impacts and human activities (COUCEIRO *et al.*, 2010).

Cerrado, the Brazilian savannah, is considered one of the most biodiverse and threatened biomes in the world (OLIVEIRA & MARQUIS, 2002), and with high endemism. Nevertheless, around 40% of academic works concerning to Cerrado's macroinvertebrates remain only in academic theses, and unpublished in scientific journals (PADOVESI-FONSECA *et al.*, 2015).

Therefore, it is of great value to carry out studies and monitoring of Cerrado waters, paying attention to spring and headwater areas aimed at effective systemic conservation and their biological diversity.

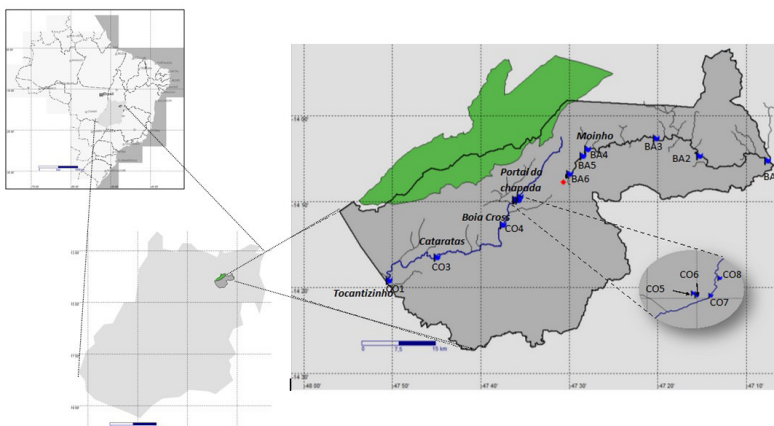
This work aims at presenting the benthic macroinvertebrates of Chapada dos Veadeiros rivers, associating them with the water quality of these environments.

2 MATERIAL AND METHODS

The present study was carried out in two river basins located north of Goiás, Brazil, in a high-altitude Cerrado region of Chapada dos Veadeiros: the Rios dos Couros and the Rio São Bartolomeu (Figure 1).

The headwater of the Couros River is located in the Chapada dos Veadeiros National Park, close to Morro do Capão Grosso, 1,638m in altitude, and runs 71.5 km east wards of the park. São Bartolomeu River originates on the outskirts of the municipality of Alto Paraíso de Goiás, is 74 km long and moves easterly towards the Macacão River.

Figure 1. Geographic location of the sampling points, Rio dos Couros (CO) and Rio São Bartolomeu (BA), Chapada dos Veadeiros-GO, Brazil. Prepared by Thomas Doucen.



The regional climate is tropical (classification's Köppen), with high rainfall since November to January, with the drier period during June and August, with annual rainfall between 1,500 and 1,750 mm.

Field expeditions were carried out in the rainy (October to December) and dry (May and July) periods, with seven sampling points on the dos Couros River and six on the São Bartolomeu River.

Figure 2. Collection of benthos in river sediment, using a sieve and type D net. Chapada dos Veadeiros, GO. Image: Maria Júlia Martins Silva.



The benthic organisms were actively collected using sieves for one hour at each point. In the passive form, it was used a sieve with a "D" rim for benthos. Next, the substrate was collected and fixed in 70% alcohol (Figure 2).

In the laboratory, the collected biological material was screened using sieves with a mesh size of 1.19 mm and porosity of 4.5 mm. The organisms were identified using keys from MERRITT & CUMMINS (2008) and HAMADA *et al.* (2019). The individuals were identified at orders level and deposited in the Aquatic Invertebrate Collection of the University of Brasília (CIAq – UnB).

3 RESULTS

A total of 2,064 individuals were collected, with 1,136 from the São Bartolomeu River and 928 from the Couros River.

Eight orders of benthic macroinvertebrates were recorded in both rivers (Figures 3 and 4). Odonata had greater abundances throughout the study; in the São Bartolomeu River it ranged from 42.7 to 19.5%; in the Couros River it varied from 45.4 to 28.3%.

Coleoptera was very representative in the São Bartolomeu River in all collection periods (28.1%, dry/2011; 14.9%, rainy/2011; 11.3%, dry/2012; 15.6%, rainy/2012).

Diptera ranged 24.2% in the Couros River, along the dry season/2011; and Hemiptera accounted for 32.5% in the Couros River, in dry/2012.

Concerning to EPT (Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera), Plecoptera had reduced abundances, with the highest value obtained in the São Bartolomeu River (16.7%, dry/2012). High abundance of Ephemeroptera was obtained for both watercourses. In the São Bartolomeu River, this order predominated during the rainy season (31.3%, 2011; 35.1%, 2012). In turn, in the Couros River this order was predominant in the dry season (26.2%, 2011; 30%, 2012). Trichoptera was dominant in São Bartolomeu River (dry/2012, 59%), and predominant in the Couros river (dry/2011, 21.2%).

For both watercourses, organisms' abundance and species richness were greater in the dry season (MARTINS-SILVA *et al.*, *in prep.*).

Figure 3. Benthic macroinvertebrates (orders, %) for the São Bartolomeu River, for the dry and rainy periods, 2011 and 2012. Chapada dos Veadeiros, GO, Brazil.

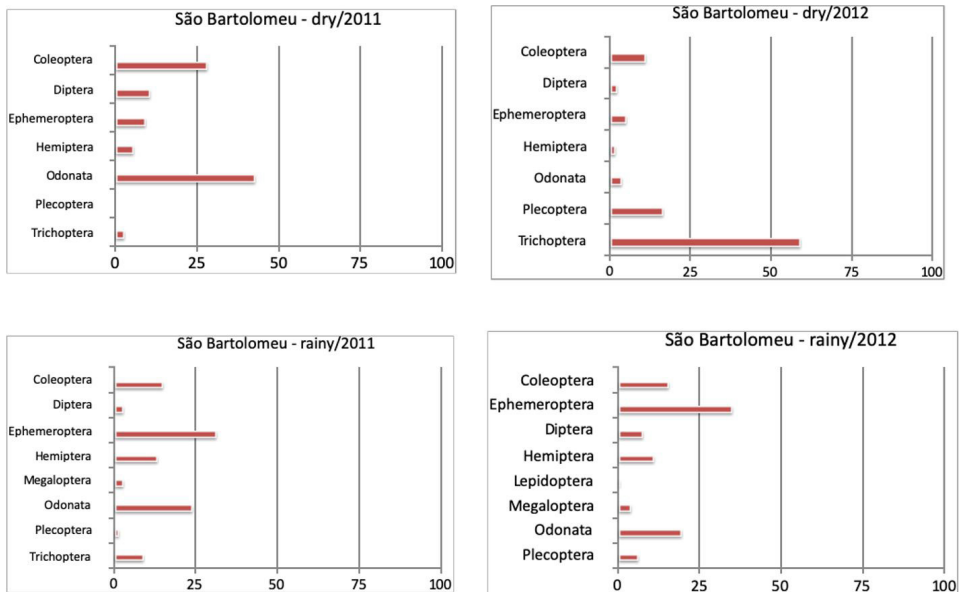
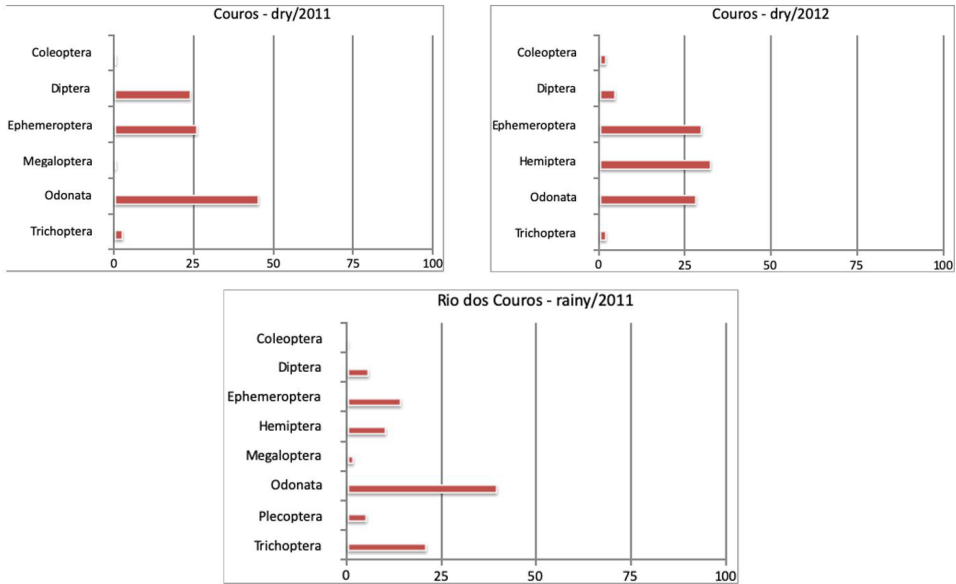


Figure 4. Benthic macroinvertebrates (orders, %) for the Couros River, for the dry and rainy seasons, 2011 and 2012. Chapada dos Veadeiros, GO, Brazil.



4 DISCUSSION

The structuring of zoobenthos in lotic environments involves biological interactions, availability and quality of resources, type of sediment or substrate, and current speed (ESTEVES *et al.*, 2011). In small rivers and headwaters, showed in this study, habitat heterogeneity is one of the driving factors in biological diversity. Heterogeneous environments favor the colonization of high taxonomic variety as well as trophic guilds, carnivores, herbivores, detritivores and collectors of fine particles. As an example, FIDELIS *et al.* (2008) recorded differences in benthic macrofauna depending on the type of substrate in Amazonian streams.

Differences in the participation of predators in benthos assemblages were observed between the two watercourses. Predator species generally have broad tolerance to environmental variations. Coleoptera, the aquatic beetles, was predominant in the São Bartolomeu River, but with minimal occurrence in the Couros River. Odonata, also called dragonflies, with their voracious predatory aquatic nymphs, was present in both streams in the dry period of 2011. They were present in both streams in the 2011 dry period. However, in other seasons, they were more abundant in the Couros River. In streams, Odonata nymphs are associated with the banks, in unconsolidated sediments, leaf litter, trunks and aquatic vegetation (BORGES *et al.*, 2019). The third group of predators, Megaloptera, occurred with very low abundance during the study period.

Species more sensitive to organic pollution, not tolerant to low concentrations of dissolved oxygen, and thus, indicators of excellent quality water, were present in both streams. These are species that inhabit transparent, oxygenated running waters; and, in most cases, low-order streams. These orders, Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera, the triade EPT. Ephemeroptera was the most abundant of this group. This order is commonly recorded in preserved areas (COMPIN & CÉRÉGHINO, 2003), although it also has records in areas with a lower level of environmental conservation (ROMERO *et al.*, 2013).

In turn, Trichoptera and Plecoptera were in low abundance in these watercourses, except in the dry period/2012, in which Trichoptera was dominant. Trichoptera colonizes sediments selectively, as the species select specific material to build their homes (MORETTI *et al.*, 2009). The immatures of this order act as shredders, that is, they use fragmented plant material, both for their food and for building their shelters. Trichoptera and Plecoptera prefer to colonize low-order streams, being very important in aquatic trophic chains.

The order Diptera generally occurs in all waterways. However, the relative occurrence of its specimens determines the quality of the environment, since its larvae tolerate a wide range of pollutants in the water. In turn, Hemiptera order is found in adulthood. Hemiptera organisms are omnivorous sucking, using their mouthparts to suck out the inside of their prey. This order occurs in pristine and little polluted environments, preferably with prey available for food (ESTEVES *et al.*, 2011).

In the present study, the annual dry and rainy seasons did not influence the composition of the benthic macrofauna orders. PEREIRA *et al.* (2017) confirmed that the type of substrate is one of the markers of benthos distribution, and that seasonal periods have less influence. However, stream level fluctuations are more pronounced during the rainy season (PIO *et al.*, 2018). Even though eight orders of benthic organisms were recorded in the two rivers, the diversity of species as well as the abundance of organisms were greater during the dry period (MARTINS-SILVA *et al.*, *in prep.*). A similar pattern was observed in low-order watercourses in Brazil (PIO *et al.*, 2020).

Previous studies carried out in Cerrado waters found that the rainfall regime is essential in the benthic temporal variation in streams (OLIVEIRA *et al.*, 1999; RIBEIRO & UIEDA, 2005). Despite this, it cannot be said that there is a seasonal pattern regarding the diversity of benthic macroinvertebrates in tropical streams. Although many studies have found greater taxonomic richness in dry periods (BAPTISTA *et al.*, 2001; CALLISTO *et al.*, 2005), other studies have not found differences between seasons (PEREIRA *et al.*, 2017; PIO *et al.*, 2018).

Headwater streams, as presented in this study, are greatly influenced by the region's rainfall regime, because if rain occurs at their springs, the watercourses quickly increase their volume. These are called water balls or waterheads. During peak rainfall, streams are very high in volume, making field collections difficult. Some groups of benthos are carried by the current, and their habitats undergo changes, affecting their diet as well as environmental conditions (BISPO *et al.*, 2001).

Couros and São Bartolomeu streams situated in the same climatic region, with predominant and well-preserved Cerrado vegetation. The riparian vegetation is generally well preserved, and it is only partial in some sections. In the study region, the temporal dynamics of these water courses is characterized by periods of flood and drought, which can determine the structure of benthic macrofauna assemblages (LAKE, 2000).

The differences relate to the type of sediment and the topography of the relief. Couros River has a rocky bed, with rapids interspersed with backwaters and pools along its course. This stream crosses relief with very steep slopes, as occurs at its spring and at Waterfall's Couros. São Bartolomeu River has a flatter basin and a less stony and more clayey bed.

As similar results were obtained in the structure of benthic macroinvertebrate assemblages in both streams, with greater abundance and taxonomic richness during dry periods, it can be assumed that the rainfall regime in the region was the main factor in driving the assemblages of this biota. Climatic variations can alter the structure of the habitat and determine the colonization and establishment of benthos in lotic environments (MELO, 2009). In rainy seasons, an increase in flow causes erosion of soil particles in the basin, destabilizes the substrate, and reduces the number of available habitats, in addition to causing the dragging of organisms (DUDGEON & WU, 1999; SILVEIRA *et al.*, 2006). Furthermore, it is during the rainy season that immature benthic organisms undergo metamorphosis, becoming winged adults. In contrast, during the dry period there is a decrease in water flow, which increases the stability of the substrate, and allows the establishment of organisms in the river substrate BISPO *et al.*, 2001; OLIVEIRA & NESSIMIAN, 2001).

5 FINAL CONSIDERATIONS

Benthic macrofauna represents an important component of aquatic communities. Benthic organisms are widely distributed and occur in different types of substrates. As presented in this chapter, its distribution is influenced by several factors, such as characteristics of habitats, river flow, rainfall regime, land use in the basins, among

others. Changes in these characteristics, combined with changes in the use of its banks and disposal of polluting substances, mean that benthic organisms are widely used as bioindicators of water quality.

Studies carried out in Brazilian Savannah waters in preserved regions such as Chapada dos Veadeiros, Brazil, are eligible tools for configuring reference areas and directing environmental monitoring plans and structural bases for more effective environmental protection.

6 ACKNOWLEDGEMENTS

This chapter is the product of research carried out by Nucleus of Limnological Studies (NEL), at the University of Brasília, Brazil. The Research Group is registered with the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil. We thank Thomas Doucen for creating the map, Alef Brito Neiva and Luiza Xavier for field and laboratory assistances. We thank Roller Ibañez R. for the translation into English, with suggestions for revising the text.

REFERENCES

BAPTISTA, D.F.; DORVILLÉ, L.F.M.; BUSS, D.F.; NESSIMIAN, J.L. **Spatial and temporal organization of aquatic insects assemblages in the longitudinal gradient of a tropical river.** Revista Brasileira de Biologia, 61(2), 295-304, 2001.

BORGES, L.R.; BARBOSA, M.S.; CARNEIRO, M.A.A.; *et al.* Dragonflies and damselflies (Insecta: Odonata) from a Cerrado area at Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brazil. Biota Neotropica, 19(1), e20180609, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2018-0609>

BISPO, P.C.; OLIVEIRA, L.G.; CRISCI, V.L.; SILVA, M.M. A pluviosidade como fator de alteração da entomofauna bentônica (Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera) em córregos do Planalto Central do Brasil. Acta Limnologica Brasiliensia, 13(2), 1-9, 2001.

CALLISTO, M.; GOULART, M.; MEDEIROS, A.O.; *et al.* Diversity assessment of benthic macroinvertebrates, yeasts, and microbiological indicators along a longitudinal gradient in Serra do Cipó, Brasil. Brazilian Journal of Biology, 64(2), 743-755, 2005.

COMPIN, A.; CÉRÉGHINO, R. Sensitivity of aquatic insect species richness to disturbance in the Adour-Garonne stream system (France). Ecological Indicators, 3, 135-142, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-160X\(03\)00016-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-160X(03)00016-5)

COUCEIRO, S.R.M.; HAMADA, N.; FORSBERG, B.R.; PADOVESI-FONSECA, C. Effects of anthropogenic silt on aquatic macroinvertebrates and abiotic variables in streams in the Brazilian Amazon. Journal of Soils and Sediments, 10, 89-103, 2010.

DUDGEON, D.; WU, K.K.Y. Leaf litter in a tropical stream: Food or substrate for macroinvertebrates? Archiv für Hydrobiologie, 146(1), 65-82, 1999.

ESTEVEZ, F.A.; LEAL, J.J.F.; CALLISTO, M. Comunidade bentônica In: ESTEVES, F.A. Fundamentos de Limnologia. 3ed. Rio de Janeiro: Interciência, p. 581-603, 2011.

FIDELIS, L.; NESSIMIAN, L.; HAMADA, N. **Distribuição espacial de insetos aquáticos em igarapés de pequena ordem na Amazônia Central.** *Acta Amazonica*, 38(1), 127-134, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000100014>

HAMADA, N.; NESSIMIAN, J.L.; QUERINO, R.B. **Insetos Aquáticos na Amazônia Brasileira: taxonomia, biologia e ecologia.** 1ed., Manaus: INPA, 724 pp, 2019.

LAKE, P.S. **Disturbance, patchiness, and diversity in streams.** *Journal of the North American Benthological Society*, 19(4), 573-592, 2000.

MELO, A.S. **Explaining dissimilarities in macroinvertebrate assemblages among stream sites using environmental variables.** *Zoologia*, 26(1), 79-84, 2009.

MERRITT, R.W.; CUMMINGS, K.W. **An Introduction to the Aquatic Insects of North America.** Kendall/Hunt Publishing Company. 892 pp, 2008.

MORETTI, M.S.; LOYOLA, R.D.; BECKER, B.; CALLISTO, M. **Leaf abundance and phenolic concentrations codetermine the selection of case-building materials by *Phylloicus* sp. (Trichoptera, Calamoceratidae).** *Hydrobiologia*, 630, 199-206. DOI 10.1007/s10750-009-9792-y

OLIVEIRA, P.S.; MARQUIS, R.J. **The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a Neotropical savana.** New York: Columbia University Press, 424 pp, 2002.

OLIVEIRA, L.G.; BISPO, P.C.; CRISCI, V.L.; SOUZA, K.G. **Distribuições de categorias funcionais alimentares de larvas de Trichoptera (Insecta) em uma região serrana do Brasil Central.** *Acta Limnologica Brasiliensis*, 11(2), 173-183, 1999.

PADOVESI-FONSECA, C. Caracterização dos ecossistemas aquáticos do Cerrado. In: SCARIOT, A. *et al.* (org.). **Biodiversidade, ecologia e conservação do Cerrado.** Brasília: MMA, p. 415-429, 2006.

PADOVESI-FONSECA, C.; MARTINS-SILVA, M.J.; PUPPIN-GONÇALVES, C.T. **Cerrado's areas as a reference analysis for aquatic conservation in Brazil.** *Biodiversity Journal*, 6, 805-816, 2015.

PEREIRA, T.S.; PIO, J.F.G.; CALOR, A.R.; COPATTI, C.E. **Can the substrate influence the distribution and composition of benthic macroinvertebrates in streams in northeastern Brazil?** *Limnologica*, 63(1), 27-30, 2017.

PIO, J.F.G.; PEREIRA, T.S.; CALOR, A.R.; COPATTI, C.E. **Organization of the benthic macroinvertebrate assemblage in tropical streams of different orders in North-Eastern Brazil.** *Ecologia Austral*, 28(1), 113-122, 2018.

ROMERO, R.M.; CENEVIVA-BASTOS, M.; BAVIERA, G.H.; CASATTI, L. **Estrutura de comunidades de insetos aquáticos (Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera) em riachos de Cerrado nas bacias dos rios Paraguaí, Paraná e São Francisco.** *Biota Neotropica*, 13(1), 97-107, 2013.

RIBEIRO, L.O.; UIEDA, V.S. **Estrutura da comunidade de macroinvertebrados bentônicos de um riacho de serra em Itatinga, São Paulo, Brasil.** *Revista Brasileira de Zoologia*, 22(3), 613-618, 2005.

SILVA-LEITE, M.; MOURA, C.O.; MARTINS-SILVA, M.J. **Insetos Bentônicos como bioindicadores de qualidade ambiental no Jardim Botânico de Brasília.** *Heringeriana*, 16, e917962, 2021.

SILVEIRA, M.P.; BUSS, D.F.; NESSIMIAN, J.L.; BAPTISTA, D.F. **Spatial and temporal distribution of benthic macroinvertebrates in a southeastern Brazilian river.** *Brazilian Journal of Biology*, 66(2), 623- 632, 2006.

SOBRE O ORGANIZADOR

EDUARDO EUGENIO SPERS realizou pós-doutorado na Wageningen University (WUR), Holanda, e especialização no IGIA, França. Possui doutorado em Administração pela Universidade de São Paulo (USP). Foi Professor do Programa de Mestrado e Doutorado em Administração e do Mestrado Profissional em Comportamento do Consumidor da ESPM. Líder do tema Teoria, Epistemologia e Métodos de Pesquisa em Marketing na Associação Nacional de Pós-Graduação e Pesquisa em Administração (ANPAD). Participou de diversos projetos de consultoria e pesquisa coordenados pelo PENZA e Markestrat. É Professor Titular no Departamento de Economia, Administração e Sociologia, docente do Mestrado em Administração e Coordenador do Grupo de Extensão MarkEsalq no campus da USP/Esalq. Proferiu palestras em diversos eventos acadêmicos e profissionais, com diversos artigos publicados em periódicos nacionais e internacionais, livros e capítulos de livros sobre agronegócios, com foco no marketing e no comportamento do produtor rural e do consumidor de alimentos.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Alternaria alternata 88, 89, 92
Alternaria arborescens 88, 89, 92
Altitude Cerrado 111, 112
Anaplasmosis 35, 36, 37, 39, 40, 41
Anticuerpos 35, 36, 38, 39, 50, 51, 52
Antioxidants 78, 80, 81, 82, 86
Auxinas 25, 30, 31

B

Benthos 111, 113, 115, 116, 117
Biodiversidad 101, 109
Biological indicators 111, 118

D

Descritores de semilla 2
Diagnóstico 36, 50, 52, 53

E

ELISA anti-Map 50, 51, 52

F

Feedlot nitrogen efficiency 42
Feedlot phosphorus efficiency 42
Fermentação ácido-láctica 55, 59
Fitomejoramiento 11

G

Germinación de semilla 2
Germoplasma 8, 13, 101, 102, 103, 104, 108

H

Hibridación 2, 3, 7, 8, 11, 12
Humulus lupulus L 25, 33

I

Injertos 18

Inmunoprotección 36

logurte-tipo 55, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 68, 69, 70, 71, 72

L

Light microscopy 88

Limón Persa 18, 19, 20, 23

M

Maíz pigmentado 2, 11

Maíz sintético 11

Mass balance feedlot 42

N

Necrotrophic fungi 88

Non-alcoholic wine 78, 80, 83, 84, 86, 87

P

Paratuberculosis ovina 50, 54

Polyphenols 75, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86

Preservación 101

Prevalencia 35, 36, 37, 38, 39, 51, 52

Pristine waters 111

Producción de plantas 18, 19

Propagação vegetativa 24, 25, 26, 31, 32, 33

R

Raza 13, 50, 51, 53

Reologia 55

S

Stemphylium vesicarium 88, 89, 92, 95, 97, 99

T

Técnicas de manejo 18

V

Vanilla spp 101, 103

Vigor híbrido 2, 5

Z

Zea mays L 3, 8, 11, 12, 17