

IBCIENCIAS

IBCIENCIAS

IBCIENCIAS



IBCIENCIAS



www.biociencias.unach.mx/ibciencias



Volumen 5 · Número 2 · Diciembre · 2022

Revista científica electrónica

Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas, México



Volumen 5 · Número 2 · Diciembre · 2022

www.biociencias.unach.mx/ibciencias

IBCIENCIAS, volumen 5, número 2, Julio-Diciembre 2022, es una revista científica digital de publicación semestral editada por la Universidad Autónoma de Chiapas, a través del Instituto de Biociencias, Boulevard Príncipe Akishino sin número, Col. Solidaridad 2000, Tapachula, C.P. 30798, Chiapas, México. Tel. (962) 64 2 7972, www.biociencias.unach.mx/ibciencias, ibciencias.revista@gmail.com. Editor responsable: Dr. Alfredo Vázquez Ovando. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No. 04-2022-070614284600-102, ISSN en trámite, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número Dr. Alfredo Vázquez Ovando; Boulevard Príncipe Akishino sin número, Col. Solidaridad 2000, Tapachula, C.P. 30798, Chiapas, México.

CONTENIDO

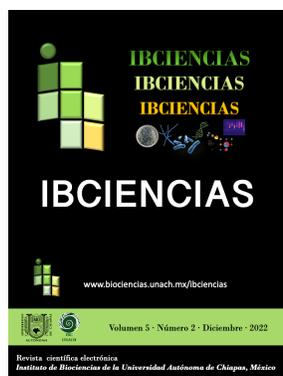
Diciembre de 2022 / Vol 5 / Num 2

- 18-25** **Capacidad probiótica preliminar de bacterias ácido lácticas aisladas de diferentes fuentes.** Antonia Alelí Vázquez-Ortiz, Alfredo Vázquez-Ovando, Sonia Ruiz- González, Gemelli López-Martínez, María Guadalupe De Gyves- Córdova, José David Mejía-Reyes.
- 26-32** **Herramientas genéticas empleadas para evaluaciones de germoplasma de mango.** Rudier Solís-Rivera, Raymundo Rosas-Quijano, Alfredo Vázquez- Ovando, Didiana Gálvez-López.
- 33-40** **Digestibilidad *in vivo* en tilapia (*Oreochromis niloticus*) de la pasta residual fermentada de semillas de *Jatropha curcas*.** Yadira del Carmen López-Martínez, Sonia Ruiz-González, Isidro Ovando-Medina.
- 41-48** **Diferencias morfo-fisiológicas en plántulas de malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) obtenidas en sistema de inmersión temporal.** Ana Karen Méndez-López, Sonia Ruiz-González, Isidro Ovando-Medina.
- 49-54** **Evaluación en campo de *Serratia marcescens* IBCCR18 como agente de biocontrol de la roya del café.** Benjamín Moreno-Castillo, Abdías Espada-Sánchez, Miguel Salvador- Figueroa, María de Lourdes Adriano-Anaya.
- 55-60** **Desarrollo del banano variedad "Piña" cultivado con sistema orgánico.** Miguel Salvador-Adriano, Alina Villalobos-Hau, Miguel Salvador-Figueroa, Benjamín Moreno-Castillo, María de Lourdes Adriano-Anaya.



Volumen 5 · Número 2 · Diciembre · 2022

www.biociencias.unach.mx/ibciencias



Capacidad probiótica preliminar de bacterias ácido lácticas aisladas de diferentes fuentes

Antonia Alelí Vázquez-Ortiz, Alfredo Vázquez-Ovando*, Sonia Ruiz-González, Gemelli López-Martínez, María Guadalupe De Gyves-Córdova, José David Mejía-Reyes

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

El consumo regular de bacterias probióticas resulta en beneficio de la salud. Los objetivos de este estudio fueron primeramente aislar bacterias ácido lácticas (BAL) de diversas fuentes y evaluar su capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, y posteriormente caracterizar preliminarmente su capacidad probiótica junto a 9 cepas aisladas de trabajos previos. De este estudio, se aislaron 34 cepas de diferentes fuentes en agar MRS, de las cuales 16 fueron catalasa y oxidasa negativas y Gram positivas. A estas cepas se les evaluó su capacidad para inhibir a *Salmonella* sp. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. El total de las cepas presentó actividad antibacteriana. Las cepas que mostraron actividad antimicrobiana inhibieron a uno o más patógenos. La cepa IAMm4 destacó por inhibir a los cuatro patógenos, además de obtener el valor más alto del halo de inhibición contra *S. aureus* (25.37 mm). Similarmente, la cepa TEJ10m3 exhibió un halo de 24.37 mm contra *Salmonella* sp. y la cepa AGCm3 un halo de 24.47 mm contra *E. coli*. Además de las 16 cepas aisladas se incluyeron 6 cepas aisladas en un trabajo previo. A las 25 cepas se evaluó su capacidad para crecer a pH 6.5, 3.0 y 2.5 y la susceptibilidad a antibióticos. Las cepas CM4.C2.2 y FM4.CI.2, logran sobrevivir a pH 3.0 y las cepas AGCm3 y QM2C1 lograron sobrevivir a pH 2.5. Para ninguno de los antibióticos empleados se observó resistencia en el total de las 25 cepas evaluadas. Estos resultados demuestran que las cepas pueden ser usadas como potenciales probióticos. Estudios complementarios pueden ayudar a clarificar la naturaleza probiótica, así como la identidad de las cepas aquí presentadas.

Palabras clave:

Listeria monocytogenes
Resistencia a antibióticos
Salmonella sp.
Staphylococcus aureus
Tolerancia a pH

Keywords:

Listeria monocytogenes
Resistance to antibiotics
Salmonella sp.
Staphylococcus aureus
pH tolerance

Preliminary probiotic ability of lactic acid bacteria isolated from several sources

Abstract

Regular consumption of probiotic bacteria results in health benefits. The objectives of this study were: firstly, to isolate lactic acid bacteria (LAB) from various sources and evaluate their ability to inhibit the growth of pathogenic bacteria, and secondly to preliminarily characterize their probiotic capacity together with 6 strains isolated from previous work. From this study, 34 strains were isolated from different sources on MRS agar, of which 16 were catalase and oxidase negative and Gram positive. These strains were evaluated for their ability to inhibit *Salmonella* sp. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. All the strains showed antibacterial activity inhibited one or more pathogens. The IAMm4 strain stood out for inhibiting the four pathogens, in addition to obtaining the highest value of the inhibition diameter against *S. aureus* (25.37 mm). Similarly, strain TEJ10m3 exhibited a diameter of 24.37 mm against *Salmonella* sp. and the AGCm3 strain a diameter of 24.47 mm against *E. coli*. In addition to the 16 isolates, 6 isolates from a previous study were included to assess their ability to grow at pH 6.5, 3.0 and 2.5 and their susceptibility to antibiotics. The CM4.C2.2 and FM4.CI.2 strains managed to survive at pH 3.0 and the AGCm3 and QM2C1 strains managed to survive at pH 2.5. For none of the antibiotics used, resistance was observed in the total of the 25 strains evaluated. These results demonstrate that the strains can be used as potential probiotics. Complementary studies can help to clarify the probiotic nature, as well as the identity of the strains.

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,
Universidad Autónoma de
Chiapas.
Boulevard Príncipe Akishino
sin número, Colonia
Solidaridad 2000, CP.
30798.
Tapachula, Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9626427972.
Correo-electrónico:
jose.vazquez@unach.mx

1. Introducción

Las bacterias ácido lácticas (BAL) desempeñan un papel importante en los sectores alimentarios, agrícolas y clínicos (Szutowaska y Gwiazdowska et al., 2021). Este grupo de bacterias incluye a cuatro géneros que son las más ampliamente utilizadas, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (Zheng et al., 2020). Su actividad metabólica consiste en utilizar el azúcar disponible para producir además de los metabolitos primarios una serie de metabolitos secundarios entre los que se encuentran los de naturaleza antimicrobiana como ácidos orgánicos (principalmente ácido láctico y acético), diacetaldehído, reuterina y bacteriocinas (Lavermicocca et al., 2021). Muchas de las BAL son consideradas bacterias probióticas, principalmente aquellas que han demostrado alto potencial para ejercer efectos benéficos para la salud humana (Dos Santos et al., 2021). Dentro de los principales beneficios, se ha reportado que ayudan a la reducción del pH en el intestino, producen enzimas digestivas, recolonizan y restablecen la biota intestinal, producen péptidos bioactivos, mejoran la absorción de calcio, son resistentes al ácido y la bilis además de estimular la respuesta inmune del hospedador e influir en actividades metabólicas tales como la producción de vitaminas y asimilación de colesterol (Lemme et al., 2021). Sin embargo, su uso también supone una preocupación y es referente a la transmisión de genes de resistencia a antibióticos hacia bacterias patógenas en el intestino; por lo tanto, es altamente deseable que los probióticos sean sensibles a los antibióticos prescritos comúnmente en baja concentración (Fernández-Roblero et al., 2020).

En la actualidad, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), ocasionan problemas de salud a nivel mundial, ya que alrededor del 70% de las diarreas se originan por la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos (Zúñiga et al., 2017). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, en el mundo, la incidencia anual de diarreas es de 1 500 millones de casos, y 3 millones de niños menores de cinco años mueren anualmente por esta misma causa (Olea et al., 2019). Las especies de microorganismos más comúnmente implicadas en estos casos son *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. (Bai et al., 2021). Ante el problema de resistencia a los antibióticos, las BAL probióticas son una opción viable para controlar patógenos, por lo que existe una búsqueda constante de este tipo de microorganismos.

La búsqueda de tales probióticos ha llevado a que sean aislados de diversas fuentes, principalmente de alimentos y bebidas fermentados, frutas y vegetales (Swain et al., 2014). Verón et al. (2017) aislaron a partir del jugo de nopal fermentado 17 BAL y reportan que la mayoría de las cepas fueron resistentes a pH 3, pero solo 3 cepas (S-22, S-811 y S-TF2) sobrevivieron a pH 2. Del mismo modo, Sakandar et al. (2019) aislaron tres cepas de BAL de frutas (melocotón, plátano y kiwi) y cinco de flores (girasol, narciso, rosa amarilla y rosa rosa); todas las cepas mostraron

supervivencia a los diversos niveles de pH probados (2, 2.5, 3 y 7.4). También se reporta que *L. kunkeei* presenta elevada tolerancia a las sales biliares mientras que *L. plantarum* ATCC 14917 exhibe tolerancia media (Sakandar et al., 2019). Los entornos relacionados con las abejas melíferas (*Apis mellifera*) también han sido fuente de BAL con potencial probiótico; Bulgasem et al. (2016) aislaron 25 BAL de muestras de miel, cuatro de estas cepas mostraron actividad antimicrobiana contra *Candida* spp. y se identificaron como *Lactobacillus plantarum*, *L. curvatus*, *Pediococcus acidilactici* y *P. pentosaceus*. Hamdy et al. (2017) aislaron dos cepas de BAL (N4 y N5) a partir del intestino de abeja y miel, éstas cepas demostraron ser termo y halo tolerantes, además que exhibieron resultados prometedores en las pruebas de tolerancia a condiciones ácidas, alcalinas, sales biliares y pancreáticas, prueba de susceptibilidad a antibióticos. Karami et al. (2017) evaluaron el efecto antagonista de BAL aisladas de productos lácteos y reportan efecto inhibitorio contra *S. aureus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* con halos de inhibición mayores a 15 mm. Falfán-Cortés et al. (2022) aislaron cepas de BAL con actividad antagonista contra *L. monocytogenes* y *S. aureus*, las cepas con mayor actividad antagonista fueron nueve aislados de muestras de pulque, frijoles germinados, queso rancharo y queso Tenate con halos de inhibición de entre 17.0 y 19.3 mm.

Muchos estudios han demostrado que las BAL son las mejores candidatas para utilizarse contra las bacterias que producen ETA. Sin embargo, como se reporta podrían ser más útiles aquellas que además de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas exhiban otras características probióticas como, tolerancia a pH ácido, tolerancia a sales biliares y sensibilidad a los antibióticos (Frakolaki et al., 2021). Por lo anterior el presente trabajo tuvo como objetivos, primero aislar bacterias ácido lácticas de diversas fuentes con capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas; posteriormente realizar pruebas adicionales para caracterizar el potencial probiótico tanto de las bacterias aisladas en este estudio como de bacterias aisladas en trabajos previos que exhiben actividad antimicrobiana.

2. Materiales y métodos

2.1. Bacterias ácido lácticas

Se colectaron 16 tipos de muestras diferentes. Estas incluyeron vegetales como tomate (*Solanum lycopersicum* L.), cebolla (*Allium cepa*), papa (*Solanum tuberosum*), lechuga (*Lactuca sativa*), zanahoria (*Daucus carota*), nopal (*Opuntia ficus-indica*), naranja (*Citrus X sinensis*). También se realizaron muestreos de bebidas fermentadas como el tepache (elaborada a partir de jugo y trozos de piña), tejuino (elaborado a base de atole de maíz fermentado) y aguamiel de cacao (líquido claro extraído de la fermentación del mucílago del cacao). Otras muestras incluyeron productos de la colmena (miel y propóleo de *Apis mellifera*); así como intestinos de abejas sin aguijón (*Scaptotrigona mexicana*) y

abejas europeas (*A. mellifera*). Para los aislamientos se siguió el procedimiento descrito por Fernández-Roblero et al. (2020).

Para las muestras vegetales, primeramente, se aseptizaron por 5 min con una solución de hipoclorito de sodio (200 ppm), luego se lavaron con alcohol al 70% y se enjuagaron con agua estéril. Posteriormente se cortaron 100 g de vegetal con un bisturí estéril, se maceró y se colocó en 100 mL de caldo MRS por 24 h. Transcurrido el tiempo, se tomaron 100 µL de cada suspensión y se sembraron por triplicado en agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS). Todas las placas de Petri inoculadas fueron incubadas por 48 h a 37 °C en anaerobiosis.

Para el aislamiento de las BAL de las bebidas fermentadas, se tomaron directamente 100 µL de los diferentes fermentos agua miel de cacao, tepache y tejuino y se inocularon por triplicado en placas de Petri conteniendo agar MRS. Este procedimiento se realizó por triplicado. Todas las placas de Petri inoculadas fueron incubadas por 48 h a 37 °C en anaerobiosis.

Para la extracción de biota intestinal primeramente se esterilizaron las abejas, sumergiéndolas en alcohol al 70% por 5 min, posteriormente se sumergieron en agua estéril durante 5 min. Seguidamente con un bisturí estéril se cortaron las extremidades dejando solamente el estómago para la extracción de los intestinos. Se tomaron 0.5 g de tejido intestinal y se colocaron en 100 µL de agua peptonada, posteriormente se maceró con una varilla estéril y se homogenizó la mezcla. Se tomaron 100 µL y se depositaron en placas de Petri conteniendo agar MRS. Todas las placas de Petri inoculadas fueron incubadas por 48 h a 37 °C en anaerobiosis. Este procedimiento se realizó por triplicado.

Al observar crecimiento bacteriano, se seleccionaron colonias diferentes basadas en su morfología (tamaño, forma y color). Estas colonias se sembraron de manera individual en placas con agar MRS hasta lograr cultivos axénicos. A cada una de las cepas se realizaron las pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa y tinción de Gram para seleccionar a las presuntas BAL (Barrios-Roblero et al., 2019).

Adicionalmente, se emplearon nueve cepas de BAL previamente aisladas de productos lácteos por Galvez-Medina et al. (2023) las cuales fueron seleccionadas con base en su capacidad para inhibir el crecimiento tanto de bacterias patógenas para el ser humano como de hongos que deterioran a los vegetales. Las cepas están codificadas como CM3.C2, FM4.C1.2, CM1.C1, QM1.C5, CM4.C2.2, QM2.C1, DCM3.C2.1, FM1.C3, FM1.C6.1. Estas cepas fueron proporcionadas por el cepario de Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas (IBC-UNACH) y cultivadas al menos dos veces en caldo y agar MRS hasta observar la morfología típica de la cepa y viabilidad.

2.2. Bacterias patógenas

Las cepas de bacterias patógenas al ser humano fueron proporcionadas por el cepario del IBC-UNACH. Para la reactivación de las cepas patógenas se siguió el método

descrito por Guzman-Hernandez et al. (2016). La cepa de *Salmonella* sp. fue reactivada en caldo selenito-cisteína y purificada en caldo tetrionato. Después de 24 h se tomó una asada de cada medio y se sembró por estría cruzada en los medios agar *Salmonella-Shigella*, agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y agar MacConkey incubándose a 37 °C por 24 h. Para la reactivación de *L. monocytogenes* las cepas fueron sembradas en medio selectivo Oxford, las placas sembradas fueron incubadas por 48 h a 37 °C. Para la reactivación de las cepas de *S. aureus* y *E. coli* se sembraron en placas de Petri conteniendo agar Baird-Parker (BPA) suplementado con telurito de potasio y emulsión de yema de huevo. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 48 h. Se seleccionaron aquellas colonias negras con halo transparente.

2.3. Capacidad antibacteriana de las BAL

Para las cepas de BAL aisladas en el presente estudio se evaluó la capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas por el método de la gota sobre la superficie (Galvez-Medina et al., 2023). Colonias puras se transfirieron a tubos que contenían 5 mL de caldo MRS y se incubaron a 37 °C durante 24 h, posteriormente fueron sembrados en forma de punto con una micropipeta (20 µL) sobre placas de agar MRS e incubadas en condiciones anaerobias por 12 h a 37 °C.

Las bacterias patógenas se incubaron de manera individual en tubos con 5 mL de caldo infusión cerebro-corazón (BHI) (Oxoid) a 37 °C durante 12 h. Luego se transfirieron 100 µL de la suspensión a 10 mL de caldo BHI fresco. La mezcla se completó con 0.75% de agar-agar y se colocó en baño María a 45 °C. Cada mezcla conteniendo células de la bacteria patógena se vertió (superpuso) en las placas con medio MRS previamente cultivadas con BAL. Después de la semi-solidificación completa de la capa superior, las placas fueron incubadas durante 24 h a 37 °C. La actividad antagónica de las BAL contra las bacterias patógenas se confirmó mediante la formación de halos de inhibición. Se midió el diámetro de la zona de inhibición (mm) alrededor de las colonias de las BAL con un calibrador vernier (tres veces en diferentes direcciones). Como control se utilizaron placas que contenían agar MRS a los que se agregaron 20 µL de agua destilada en vez de cultivo de las BAL, vertiendo la suspensión de agar BHI conteniendo las bacterias patógenas. Las cepas de BAL que exhibieron actividad antibacteriana fueron elegidas para las pruebas posteriores.

2.4. Pruebas adicionales de potencial probiótico

Las cepas aisladas que dieron negativo a las pruebas de oxidasa y catalasa, coloración violeta en la tinción de Gram, morfología bacilar o bacilo-cocos, así como positivo en la prueba de inhibición de patógenos fueron seleccionadas para determinar otras características de potencial probiótico *in vitro*. Se incluyeron en esta prueba a las nueve cepas obtenidas del cepario provenientes del estudio de Galvez-Medina et al. (2023).

2.4.1. Tolerancia a pH ácido

De cada una de las cepas aisladas se tomaron dos asadas y se inocularon en 5 mL de caldo MRS contenido en tubos de ensayo con tapa rosca de 16 mL de capacidad y se dejó en agitación por 24 h a 30 °C. Posteriormente se centrifugó (Centrífuga 5403, Eppendorf) a 8800 g durante 10 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y el agregado celular se lavó dos veces con 5 mL (cada vez) de buffer fosfato salino (PBS, pH 7.2), centrifugando a 2380 g durante 5 min para finalmente obtener el sedimento y resuspenderlo en 1.5 mL de PBS. De esta suspensión de células, por triplicado se tomaron 50 µL para inocularlos en viales de 2 mL de capacidad conteniendo 950 µL de medio MRS fresco y ajustados a uno de tres pH, 2.5, 3.0 y 6.5 con HCl 1N. Los tubos se dejaron en agitación por 4 h a 30 °C, determinando cada 60 min el crecimiento celular (absorbancia a 560 nm) en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific GENESYS 20 (Noriega et al., 2004), usando caldo MRS fresco como blanco.

2.4.2. Resistencia a antibióticos

Se evaluó mediante la prueba de difusión en agar recomendada por *National Committee for Clinical Laboratory Standards* con las cepas activadas en caldo MRS a 37 °C durante 24 h y multidiscos combinados de antibióticos (BIO-Rad™) conteniendo amikacina (30 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cloranfenicol (30 µg), dicloxacilina (1 µg), enoxacina (10 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), netilmicina (30 µg), penicilina (10 µg), timetoprim-sulfametoxazol (25 µg).

2.5. Análisis de datos

Los datos obtenidos de las pruebas de inhibición fueron sometidos a análisis de varianza y posterior comparación múltiple de rangos por el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fischer ($\alpha=0.05$), usando el software estadístico Statgraphics Centurion XV Versión 15.2.06. Los demás datos se presentan como promedios de las repeticiones y, a partir de los datos de las cinéticas de crecimiento a distintos pH se calculó la velocidad de crecimiento (h^{-1}).

3. Resultados y Discusión

3.1. Aislamiento y selección de bacterias ácido lácticas

De las 14 muestras analizadas, se lograron aislar y purificar 34 cepas con características de colonia morfológicas presuntivas para bacterias ácido lácticas. Después de realizar las pruebas bioquímicas, se seleccionaron únicamente las cepas que dieron negativo a las pruebas de catalasa y oxidasa, así como positivo en la tinción Gram, quedando un total de 16 cepas. Las morfologías de colonia más comunes de las bacterias fueron formas circulares, puntiformes, de color blanco y de consistencias cremosa. Todas mostraron borde redondo y superficie plana, a excepción de las cepas N0m1 y NAm2 que mostraron forma fusiforme, color blanco, con texturas planas y consistencias cremosas. De las 16 cepas

seleccionadas, 3 cepas se aislaron de tejuino, 1 de tepache, 1 de aguamiel de cacao, 1 de tomate, 1 de cebolla, 1 de lechuga, 1 de papa, 1 de zanahoria, 1 de nopal, 1 de naranja, 2 de intestino de abeja, 1 de miel y 1 de propóleo. En nuestro grupo de trabajo previamente se han aislado BAL de muestras de tepache y tejuino con capacidad antifúngica (Barrios-Roblero et al., 2019), de miel de abejas sin aguijón con capacidad probiótica (Fernández-Roblero et al., 2020) pero no de frutas o de intestinos de abejas. Se aislaron BAL de tipo cocobacilos Gram positivos con forma oval del intestino de abejas meliponas, diplobacilos Gram positivos con forma ligeramente curvados del aguamiel de cacao y estreptobacilos Gram positivos con formas fusiformes reunidos en cadenas por los extremos de muestras de naranja y nopal. Estas morfologías son similares a las reportadas por Nuryshev et al. (2016).

3.2. Capacidad antibacteriana de las BAL

A las 16 cepas de BAL se realizaron pruebas de antagonismo. Todas las cepas presentaron actividad inhibitoria de los patógenos; la mayoría de las cepas presentaron actividad a más de un género de patógeno a excepción de la cepa T0m1 que solo presentó actividad contra *L. monocytogenes* (Cuadro 1).

Sobresalen por su capacidad las cepas N0m1, ZAm1, CE1m1, AGCm3, TEP5m3, TEJ1m3, TEJ7m3, TEJ10m3, ISMm4, IAMm4, MAMm5, PAMm5, mostrando actividad antagónica contra los cuatro géneros de patógenos probados en este estudio (Cuadro 1). Los halos de inhibición presentaron tamaños que van desde 1.67 mm hasta 25.37 mm. La cepa IAMm4 destaca por inhibir a los cuatro patógenos; con valores de 24.33 mm contra *L. monocytogenes*, además de obtener el valor más alto del halo de inhibición contra *S. aureus* (25.37 mm). La cepa TEJ10m3 presentó actividad antagónica contra los cuatro patógenos teniendo halos de inhibición hasta de 24.37 mm contra *Salmonella* sp. y 22.70 mm contra *E. coli*. Del mismo modo, la cepa AGCm3 provocó halos de 24.47 mm contra *E. coli* y 24.36 mm contra *L. monocytogenes* (Cuadro 1).

Los valores obtenidos fueron mayores a los valores reportado por Falfán-Cortés et al. (2022). De Medeiros et al. (2021) reportan cepas de *L. brevis* y *L. rossiae* aisladas de Chile jalapeño con actividad contra *E. coli* y *Salmonella* sp. con halos de inhibición similares a los reportados en nuestro estudio. Jung et al. (2021) aislaron cinco cepas de BAL que exhibieron actividad contra *E. coli* y *S. Typhi*, reportando diámetros mayores a los 17 mm. Existen muchos metabolitos responsables de la actividad antibacteriana de las BAL. Péptidos antimicrobianos (Fugaban et al. 2022), ácidos orgánicos, ácido fenil-láctico, y bacteriocinas son algunos de los metabolitos secundarios que actúan como mecanismo de defensa contra los patógenos (Chikindas et al., 2018; Todorov et al., 2019; Todorov et al., 2020).

Cuadro 1. Diámetro (mm) de las zonas de inhibición generadas por los aislados de bacterias del ácido láctico estudiadas contra microorganismos.

Cepa de BAL	<i>Salmonella sp.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
TEJ10m3	24.37±0.73a	20.63±0.75bc	22.63±0.45b	22.70±0.47abc
AGCm3	23.78±0.73ab	24.36±0.75a	23.33±0.45ab	24.47±0.47a
CEm1	22.7±0.73ab	22.60±0.75ab	21.49±0.45bc	19.87±0.47def
TEJ7m3	22.24±0.73abc	22.82±0.75ab	16.55±0.45d	23.48±0.47ab
TEJ1m3	20.50±0.73bcd	22.36±0.75ab	21.50±0.45bc	20.27±0.47de
TEP5m3	18.82±0.73cd	21.13±0.75ab	22.23±0.45b	21.40±0.47bcd
IAMm4	18.08±0.73de	24.33±0.75a	25.37±0.45a	17.70±0.47fg
ISMm4	18.06±0.73de	9.62±0.75ef	19.73±0.45c	18.0±0.47efg
MAMm5	14.68±0.73ef	17.24±0.75c	22.63±0.45b	23.90±0.47a
PAMm5	13.84±0.73f	21.41±0.75ab	15.95±0.45d	16.12±0.47gh
NAm2	13.33±0.73f	11.29±0.75def	0.00±0.45e	16.65±0.47gh
NOm1	9.31±0.73g	11.39±0.75def	22.22±0.45b	21.54±0.47bcd
ZAm1	6.09±0.73g	13.56±0.75d	19.39±0.45c	14.46±0.47h
PAm1	1.67±0.73h	10.21±0.75Def	0.00±0.45e	21.17±0.47cd
LEm1	0.00±0.73h	8.12±0.75f	0.00±0.45e	17.94±0.47fg
TOm1	0.00±0.73h	12.27±0.75de	0.00±0.45e	0.00±0.47i

Medias ± error estándar. Valores con una letra común no son significativamente diferentes (P>0.05).

Los halos de inhibición de las cepas proporcionadas por el cepario del IBC-UNACH van de 7.25 mm a 26.50 mm contra los patógenos *Salmonella sp.*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*; los valores puntuales pueden ser consultados en Galvez-Medina et al. (2023).

3.3. Crecimiento a distintos pH

La acidez (pH bajo) es una de las barreras cruciales que las BAL probióticas deben enfrentar para sobrevivir durante el paso del estómago al intestino. Además, la presencia de BAL como probióticos en productos alimenticios con alto contenido de ácido (pH bajo), como el yogur ácido y los encurtidos, provoca un estrés grave en estas bacterias (Mbye et al., 2020). Algunas cepas no mostraron aumento en la absorbancia a pH 6.5. Los valores de cero en la velocidad de crecimiento (Cuadro 2) para varias cepas confirman la ausencia de crecimiento. Lo anterior puede estar sugiriendo mayor adaptación de las BAL a los pH ácidos. Sin embargo, la cepa FM1.C3 mostró mayor crecimiento después de 4 h de incubación sobrepasando los 0.9 unidades de absorbancia, seguida por la cepa CM4.C2.2 sobrepasando los 0.8 unidades de absorbancia igual que la cepa FM4.C1.2 con el mismo valor (Figura 1).

Algunas cepas sobrevivieron y crecieron a pH 3.0 después de 4 h de incubación, tal es el caso de la cepa CM4.C2.2 que logra crecer arriba de 0.9 unidades de absorbancia incluso crece mejor que a pH 6.5. Además, esta cepa presentó la velocidad de crecimiento más alta a pH 2.5 (Cuadro 2). La cepa AGCm3 muestra un crecimiento exponencial ya que alcanza los 0.6 unidades de absorbancia partiendo de los 0.1 en el tiempo cero. Se ha reportado que algunas cepas de BAL cuentan con mecanismos que les permiten sobrevivir en condiciones tan ácidas como pH de 2 (Mbye et al., 2020). La cepa FM4.CI.2 también logra alcanzar los 0.7 unidades de absorbancia partiendo de 0.4 en el tiempo cero como se muestra en la Figura 3. La disminución del crecimiento de las bacterias que mostraron poca sobrevivencia a pH 2.5 y 3

podría deberse a que algunas de las bacterias necesitan mayor tiempo de adaptación, ya que al disminuir el pH también se desequilibra la actividad metabólica. Las BAL generalmente son acidófilas, lo que significa que pueden tolerar pH's bajo, pero cuando existen una gran cantidad de ácidos libres (H⁺), la sobrevivencia puede verse comprometida.

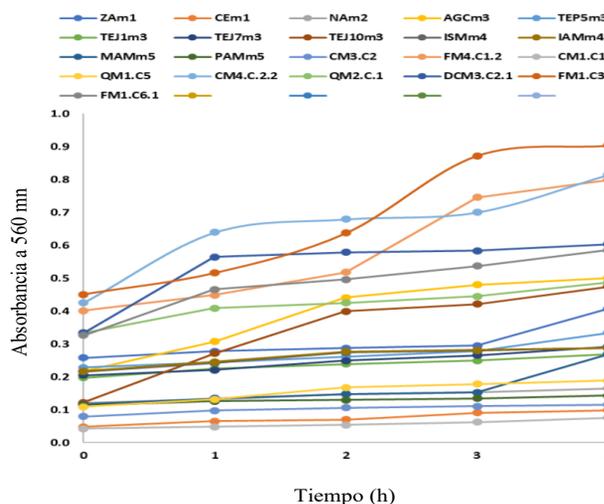


Figura 1. Cinéticas de crecimiento (absorbancia a 560 nm) a pH 6.5 de las cepas aisladas de diferentes fuentes.

Al comparar la cinética de crecimiento entre el pH 3.0 (Figura 2) y pH 2.5 (Figura 3) se observa similitud en el comportamiento de adaptación de las BAL. La cepa AGCm3 exhibió mayor tolerancia al ácido a pH 2.5, presentando valores de absorbancia de 0.1 en el tiempo cero y alcanzando los 0.8 unidades de absorbancia a pH 2.5 (Figura 4), alcanzando a este pH la mayor velocidad de crecimiento de entre todas las cepas (Cuadro 2). La cepa QM2C1 también mostró adaptación significativa a pH 2.5, superando las 0.6 unidades de absorbancia a las 4 h, partiendo de una

absorbancia de 0.1 en el tiempo cero, pero su velocidad de crecimiento es baja (Cuadro 2).

Cuadro 2. Velocidad de crecimiento (h^{-1}) de cada cepa de BAL aisladas de diferentes fuentes a tres condiciones de pH.

Cepa	pH 2.5	pH 3.0	pH 6.5
PAM1	0.00	0.02	0.01
NOM1	0.01	0.03	0.07
LEM1	0.05	0.04	0.08
TOM1	0.00	0.02	0.02
ZAM1	0.08	0.07	0.03
CEM1	0.07	0.02	0.01
NAM2	0.10	0.03	0.01
AGCm3	0.18	0.10	0.07
TEP5m3	0.01	0.02	0.02
TEJ1m3	0.02	0.02	0.01
TEJ7m3	0.02	0.02	0.02
TEJ10m3	0.02	0.02	0.08
ISMm4	0.09	0.09	0.01
IAMm4	0.04	0.05	0.01
MAMm5	0.04	0.05	0.03
PAMm5	0.07	0.02	0.00
CM3.C2	0.03	0.03	0.00
FM4.C1.2	0.10	0.09	0.09
CM1.C1	0.00	0.02	0.00
QM1.C5	0.03	0.01	0.02
CM4.C2.2	0.09	0.13	0.09
QM2.C1	0.13	0.05	0.03
DCM3.C2.1	0.12	0.04	0.06
FM1.C3	0.06	0.05	0.11
FM1.C6.1	0.04	0.07	0.06

Este crecimiento se debe a que algunas BAL cuentan con moléculas protectoras que previenen la destrucción celular interna o mejoran la fuerza celular para permitir la tolerancia de entornos hostiles. Una de esas moléculas es la ATPasa de translocación de protones que ayuda a estabilizar el pH celular interno en respuesta a un pH externo mu y bajo (Mbye et al., 2020).

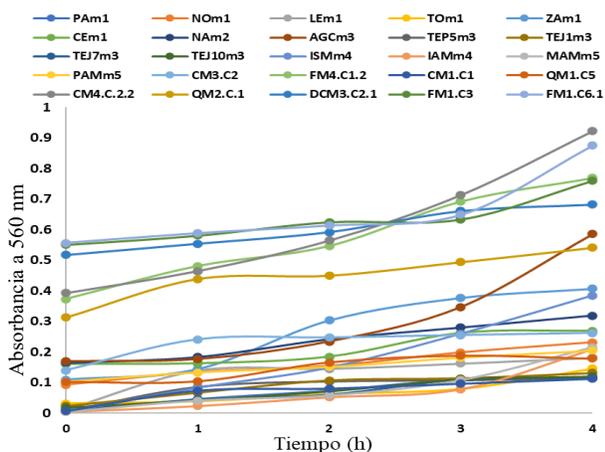


Figura 2. Cinéticas de crecimiento (absorbancia a 560 nm) a pH 3.0 de las cepas aisladas de diferentes fuentes.

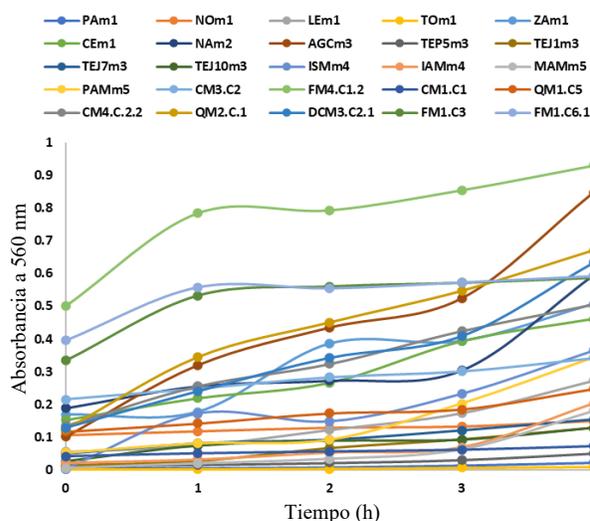


Figura 3. Cinéticas de crecimiento (absorbancia a 560 nm) a pH 2.5 de las cepas aisladas de diferentes fuentes.

Los resultados del presente estudio son similares a los reportados por Dogra et al. (2021) quienes además, sugieren que las cepas con capacidad de tolerar e incluso crecer a pH ácidos en una propiedad probióticas que ayudará a que las bacterias lleguen a los intestinos y colon y contribuyan al equilibrio de la microbiota intestinal. Fernández-Roblero et al. (2020) aislaron 10 cepas de bacterias lácticas de miel de abejas *Meliponas* probadas a pH 6.5 y 2.5 y reportan valores parecidos a los obtenidos en el presente estudio, esta similitud puede deberse a que ambos trabajos fueron realizados en la misma región.

3.4. Resistencia a antibióticos

Los resultados obtenidos en la prueba de resistencia a antibióticos se muestran en el Cuadro 3. A excepción de las cepas CEM1 y DCM3.C2.1, las demás presentaron sensibilidad a cloranfenicol. Las cepas NAM2, AGCm3, TEJ1m3 mostraron moderada sensibilidad (I) al mismo antibiótico. Las cepas TEP5m3, ISMm4, IAMm4, MAMm5, CM3.C2, FM4.C1.2, CM1.C1, QM1.C5, FM1.C3, FM1.C6.1 mostraron sensibilidad a todos los antibióticos. La mayoría de las cepas muestran moderada susceptibilidad a la ampicilina. La cepa ZAM1 muestra sensibilidad a todos los antibióticos excepto a trimetoprim-sulfametoxazol que mostró resistencia. Para ninguno de los antibióticos empleados se observó resistencia en el total de las 25 cepas evaluadas, es decir que todas las cepas sean resistentes al mismo antibiótico. Sin embargo, para aquellos antibióticos donde una alta proporción de cepas fue resistente, tal es el caso de las cepas CEM1, NAM2, TEJ1m3 Y DCM3.C2.1 mostraron resistencia a 4 o más del total de los 12 antibióticos, las otras cepas evaluadas fueron moderadamente sensibles. La transmisión de genes de resistencia a antibióticos hacia bacterias patógenas en el intestino es un problema de salud importante; por lo tanto, es deseable que los probióticos sean sensibles a los antibióticos

o que la resistencia que exhiban sea inherente al microorganismo y no haya riesgo de transferencia de genes de resistencia (Fernández-Roblero et al., 2020). Debido a

ello, la OMS sugiere en la medida de lo posible trabajar con cepas susceptibles a los antibióticos (Álvarez-Cisneros y Ponce-Alquicira, 2018).

Cuadro 3. Susceptibilidad a antibióticos de las bacterias aisladas de diferentes fuentes.

Cepa	PE	DC	ENX	NET	GE	CRO	SXT	AK	AM	E	CL	CF
PAM1	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
NOM1	I	I	R	S	I	I	S	S	I	I	S	R
LEM1	S	S	I	I	S	S	S	S	S	I	S	I
TOM1	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
ZAM1	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
CEM1	I	R	R	I	I	I	R	R	I	I	R	R
NAM2	I	I	R	R	I	I	R	R	I	I	I	S
AGCm3	S	S	S	S	I	I	I	S	S	I	I	S
TEP5m3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TEJ1m3	R	R	I	I	R	S	S	I	I	R	I	R
TEJ7m3	I	I	S	S	I	S	I	I	S	S	S	S
TEJ10m3	S	I	S	I	R	I	S	I	I	S	S	S
ISMm4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IAMm4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MAMm5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PAMm5	S	S	S	I	I	I	S	I	I	I	S	S
CM3.C2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
FM4.C1.2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CM1.C1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
QM1.C5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CM4.C2.2	I	I	S	S	I	S	S	I	I	I	S	S
QM2.C1	S	I	I	S	I	I	S	S	I	S	S	I
DCM3.C2.1	S	R	I	I	S	R	I	R	S	S	R	R
FM1.C3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
FM1.C6.1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S: susceptible; I: moderada susceptibilidad; R: resistente.
 PE: penicilina (10 µg), DC: dicloxacilina (1 µg), ENX: enoxacina (10 µg), NET: netilmicina (30 µg), GE: gentamicina (10 µg), CRO: ceftriaxona (30 µg), SXT: trimetoprim-sulfametoxazol (25 µg), AK: amikacina (30 µg), AM: ampicilina (10 µg), E: eritromicina (15 µg), Cl: cloranfenicol (30 µg), CF: cefalotina (30 µg).

4. Conclusión

Las cepas de BAL analizadas en el presente estudio, exhibieron más de una característica de interés probiótico. Solo algunas cepas (CEM1, NAM2, TEJ1m3 Y DCM3.C2.1) presentaron resistencia a 4 o más antibióticos, por lo que su uso como probiótico podría requerir de otros estudios que evidencien la naturaleza de la resistencia. La cepa AGCm3 (proveniente de aguamiel de cacao) que destacó por mayores halos de inhibición para los cuatro patógenos, creció a pH ácido y es sensible a los antibióticos se muestra como una candidata interesante para usarse como probiótico. Otros estudios complementarios pueden validar los hallazgos aquí presentados.

Conflicto de intereses

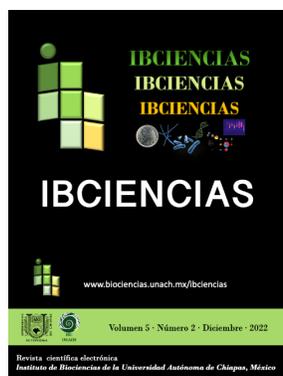
Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias

Álvarez-Cisneros YM, Ponce-Alquicira E. 2018. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria. IntechOpen 10.5772/intechopen.80624.

Bai X, Nakatsu CH, Bhunia AK. 2021. Bacterial biofilms and their implications in pathogenesis and food safety. Foods 10(9): 2117.
 Barrios-Roblero C, Rosas-Quijano R, Salvador-Figueroa M, Gálvez-López D, Vázquez-Ovando A. 2019. Antifungal lactic acid bacteria isolated from fermented beverages with activity against *Colletotrichum gloeosporioides*. Food Bioscience 29: 47-54.
 Bulgasem YB, Lani MN, Hassan Z, Yusoff WMW, Fnaish SG. 2016. Antifungal activity of lactic acid bacteria strains isolated from natural honey against pathogenic *Candida* species. Mycobiology 44(4): 302-309.
 Chikindas ML, Weeks R, Drider D, Chistyakov VA, Dicks LM. 2018. Functions and emerging applications of bacteriocins. Current Opinion in Biotechnology 49: 23–28.
 De Medeiros JC, Leandro EDS, Maldonado IR, de Alencar ER, Ribeiro CSDC, Ragassi CF. 2021. Characterization of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of jalapeno peppers (*Capsicum annuum* L.). Journal of Food Processing and Preservation 45(12): e16025.
 Dos Santos LE, Ginani VC, de Alencar ER, Pereira OG, Rose ECP, do Vale HMM, Pratesi R, Hecht MM, Cavalcanti MH, Tavares CSO. 2021. Isolation, identification, and screening of lactic acid bacteria with probiotic potential in

- silage of different species of forage plants, cocoa beans, and artisanal salami. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 13(1): 173-186.
- Dogra T, Mehra R, Kumar H, Thakur M. 2021. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented food “maleda” of northern Indian state. *Annals. Food Science and Technology* 22(1): 54-60.
- Falfán-Cortés RN, Mora-Peñaflor N, Gómez-Aldapa CA, Rangel-Vargas E, Acevedo-Sandoval OA, Franco-Fernández MJ, Castro-Rosas J. 2022. Characterization and evaluation of the probiotic potential *in vitro* and *in situ* of *Lactocaseibacillus paracasei* isolated from Tenate cheese. *Journal of Food Protection* 85(1): 112-121.
- Fernández-Roblero S, Grajales-Conesa J, Rincón-Rabanales M, Coronel-Niño R, Vázquez-Ovando A. 2020. Lactic acid bacteria isolated from the Stingless bee *Scaptotrigona mexicana* and partial characterization of their probiotic activity. *Bio Ciencias* 7: e979.
- Frakolaki G, Giannou V, Kekos D, Tzia C. 2021. A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 61(9): 1515-1536.
- Fugaban JII, Holzapfel WH, Todorov S. 2022. The overview of natural by-products of beneficial lactic acid bacteria as promising antimicrobial agents. *Applied Food Biotechnology* 9(2): 127-143.
- Galvez-Medina A, Mejía-Reyes D, Ruiz-González S, De Gyves-Córdova G, Vázquez-Ovando A. 2023. Isolation of antimicrobial lactic acid bacteria with potential use as a protective culture for ‘Queso Fresco’. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* sometido.
- Guzman-Hernandez R, Contreras-Rodriguez A, Hernandez-Velez R, Perez-Martinez I, Lopez-Merino A, Zaidi MB, Estrada-Garcia T. 2016. Mexican unpasteurised fresh cheeses are contaminated with *Salmonella spp.*, non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* and potential uropathogenic *E. coli* strains: A public health risk. *International Journal of Food Microbiology* 237: 10–16.
- Hamdy AA, Elattal NA, Amin MA, Ali AE, Mansour NM, Awad GEA, Awad HM, Esawy MA. 2017. Possible correlation between levansucrase production and probiotic activity of *Bacillus sp.* isolated from honey and honey bee. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33(4): 69.
- Jung JY, Han S-S, Kim Z-H, Kim MH, Kang HK, Jin HM, Lee MH. 2021. *In-vitro* characterization of growth inhibition against the gut pathogen of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from fermented products. *Microorganisms* 10): 2141.
- Karami S, Roayaei M, Hamzavi H, Bahmani M, Hassanzad-Azar H, Leila M, Rafieian-Kopaei M. 2017. Isolation and identification of probiotic *Lactobacillus* from local dairy and evaluating their antagonistic effect on pathogens. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 7(3):137-141.
- Lavermicocca P, Reguant C, Bautista-Gallego J. 2021. Editorial: Lactic acid bacteria within the food industry: What is new on their technological and functional role. *Frontiers in Microbiology* 12: 711013.
- Lemme-Dumit JM, Cazorla SI, Perdígón GDV and Maldonado-Galdeano C. 2021. Probiotic bacteria and their cell walls induce th1-type immunity against *Salmonella Typhimurium* challenge. *Frontiers in Immunology* 12: 660854.
- Mbye M, Baig MA, AbuQamar SF, El-Tarabily KA, Obaid RS, Osaili TM, Al-Nabulsi AA, Turner MS, Shah NP, Ayyash MM. 2020. Updates on understanding of probiotic lactic acid bacteria responses to environmental stresses and highlights on proteomic analyses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19: 1110–1124.
- Noriega L, Gueimonde M, Sánchez B, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG. 2004. Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glucosydic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology* 94(1): 79-86.
- Nuryshev MZ, Stoyanova LG, Netrusov AI. 2016. New probiotic culture of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*: Effective opportunities and prospects. *Journal of Microbiol and Biochemical Technology* 8: 290-295.
- Olea A, Díaz J, Fuentes R, Vaquero A, García M. 2019. Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile. *Revista Chilena de Infectología* 29(5): 504-510.
- Sakandar HA, Kubow S, Sadiq FA. 2019. Isolation and *in-vitro* probiotic characterization of fructophilic lactic acid bacteria from Chinese fruits and flowers. *LWT* 104: 70-75.
- Swain MR, Anandharaj M, Ray RC, Rani RP. 2014. Fermented fruits and vegetables of Asia: A potential source of probiotics. *Biotechnology Research International* 2014: 250424.
- Szutowska J, Gwiazdowska D. 2021. Probiotic potential of lactic acid bacteria obtained from fermented curly kale juice. *Archives of Microbiology* 203: 975-988.
- Todorov SD, Cavicchioli VQ, Ananieva M, Bivolarski VP, Vasileva TA, Hinkov AV, Todorov DG, Shishkov S, Haertlé T, Iliev IN, Nero LA, Ivanova IV. 2020. Expression of coagulin A with low cytotoxic activity by *Pediococcus pentosaceus* ST65ACC isolated from raw milk cheese. *Journal of Applied Microbiology* 128(2): 458–472.
- Todorov SD, de Melo Franco BDG, Tagg JR. 2019. Bacteriocins of Gram-positive bacteria having activity spectra extending beyond closely-related species. *Beneficial Microbes* 10(3): 315-328.
- Verón HE, Di Risio HD, Isla MI, Torres S. 2017. Isolation and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from *Opuntia ficus-indica* fruits that grow in Northwest Argentina. *LWT* 84: 231-240.
- Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, O’Toole PW, Pot B, Vandamme P, Walter J, Watanabe K, Wuyts S, Felis GE, Gänzle MG, Lebeer S. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70(4):2782-2858.
- Zúñiga C, Iván R, Lozano C, Vaquero J. 2017. Enfermedades transmitidas por los alimentos: una mirada puntual para el personal de salud. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 95: 94-103.



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Herramientas genéticas empleadas para evaluaciones de germoplasma de mango

Rudier Solís-Rivera, Raymundo Rosas-Quijano, Alfredo Vázquez-Ovando, Didiana Gálvez-López*

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

El mango (*Mangifera indica* L.) es el quinto cultivo más importante y consumido en el mundo. En México se cultiva en varios Estados, mayormente en la costa del Pacífico, desde Chiapas hasta el sur de Sinaloa. En México no existe programa de mejoramiento genético de la especie. Aunque se han realizado estudios sobre la diversidad genética, morfológica y bioquímica, no se ha llevado a cabo la selección de genotipos de interés comercial que propicien a futuro la selección asistida con miras a iniciar un programa sólido de mejoramiento genético. En este sentido, la presente revisión tuvo como objetivo reunir y discutir información sobre las herramientas genéticas que se han empleado en la historia del cultivo del mango en el mundo y en México para evaluar el germoplasma. También se discuten los mapas genéticos que se han construido y los avances genómicos que también se han logrado, con la finalidad de proponer ideas objetivas en la toma de decisiones sobre los rumbos que debería seguir la investigación del mejoramiento genético del germoplasma de mango en México.

Palabras clave:

Diversidad genética
Mangifera indica
 Mapa genético
 Marcadores moleculares
 Mejoramiento genético

Keywords:

Genetic diversity
Mangifera indica
 Genetic map
 Molecular markers
 Genetic improvement

Genetic tools used for mango germplasm evaluation

Abstract

Mango (*Mangifera indica* L.) is the fifth most important and consumed crop in the world. In Mexico it is grown in several states, mostly on the Pacific coast, from Chiapas to southern Sinaloa. In Mexico there is no genetic improvement program for the species. Although studies on genetic, morphological and biochemical diversity have been carried out, the selection of genotypes of commercial interest that favor assisted selection in the future with a view to starting a solid program of genetic improvement has not been carried out. In this sense, the present review aimed to gather and discuss information on the genetic tools that have been used in the history of mango cultivation in the world and in Mexico to evaluate germplasm. The genetic maps that have been constructed and the genomic advances that have also been achieved are also discussed to propose objective ideas in decision-making on the directions that research on the genetic improvement of mango germplasm in Mexico should follow.

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,
 Universidad Autónoma de
 Chiapas.
 Boulevard Príncipe Akishino
 sin número, Colonia
 Solidaridad 2000, CP.
 30798.
 Tapachula, Chiapas, México.
 Teléfono: + 52 9626427972.
 Correo-electrónico:
 didiana.galvez@unach.mx

1. Introducción

El cultivo de mango (*Mangifera indica* L.) es parte importante del modelo de desarrollo económico y social de las regiones tropicales y subtropicales de México. El mango se cultiva en México en 207, 085.77 ha y ocupa el cuarto lugar en producción mundial, con un valor anual de 2 156,039.86 ton (SIAP, 2021), generando divisas de 10.86 mil millones de pesos (SIAP, 2021). Las variedades cultivadas en México son: Ataulfo (35%), Tommy Atkins, Haden y Keitt (25%), Manila (15%) y variedades criollas (25%) (SIAP, 2021).

En México, los principales problemas que afectan al cultivo de mango son, el tamaño del árbol, producción irregular, escaso amarre de frutos, sensibilidad al frío, incidencia de plagas y enfermedades; mismos que repercuten en la productividad, el rendimiento y la calidad del fruto (Gil et al., 2013).

Para buscar atender estas situaciones, México cuenta actualmente con dos bancos de germoplasma de mango: uno en Cotaxtla, Veracruz y otro en Tapachula, Chiapas, ambos en instalaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (Gálvez-López et al., 2010b; Knudsen, 2000). Estos bancos albergan, preferentemente, variedades extranjeras y algunas mexicanas, sin embargo, los genotipos criollos mexicanos están ausentes. Algunos estudios (Gálvez-López et al., 2007; Jaramillo y Baena, 2000) han mostrado características fenotípicas deseables en el germoplasma de mango criollo de México: regularidad en la productividad, buen amarre de fruto, caracteres de sabor y olor deseables en el fruto, entre otras. Así mismo, por su desarrollo adaptativo, es probable que en dicho germoplasma pudieran existir genes de tolerancia a factores climáticos adversos y de resistencia a plagas y enfermedades, entre otros.

Para tener mayores herramientas que ayuden en la toma de decisiones sobre la selección de individuos potenciales portadores de genes y características fenotípicas promisorias, el objetivo de la presente revisión fue analizar el estado del arte de estudios de diversidad genética del mango, mapas genéticos de variedades y recursos genómicos disponibles, con la finalidad de reunir información que ayude a proponer ideas objetivas sobre los rumbos que debería seguir la investigación del mejoramiento genético del germoplasma de mango en México.

2. Herramientas genéticas empleadas para evaluar germoplasma de mango

Se han reportado numerosos estudios sobre caracterización molecular de germoplasma de mango, los cuales se enfocan principalmente al análisis de diversidad genética (De Souza y Da Costa Lima, 2004; Karihaloo et al., 2003; Luo et al., 2011; Samal et al., 2012; Ravishankar et al., 2015; Warschefsky y von Wettberg, 2019); sin embargo, pocos han contribuido al mejoramiento genético de la especie. Los estudios de diversidad genética empleando marcadores moleculares, han contribuido principalmente en la

evaluación de la diversidad genética del germoplasma, en la determinación de qué individuos son los más promisorios en el aporte de características de interés frutícola, al mismo tiempo han permitido determinar cuáles individuos aportan mayor heterocigosidad en el germoplasma (Gálvez-López et al., 2010a).

Para otras especies los marcadores moleculares han sido de ayuda en la identificación de genes de interés agroalimentario, incluso han permitido identificar regiones cromosómicas asociadas a caracteres fenotípicos importantes, hasta llegar al mejoramiento genético asistido, como es el caso de la manzana y el durazno (Cheng y Huang, 2009; Martínez-García et al., 2013; Wang et al., 2020b). Los marcadores moleculares tienen un amplio campo de aplicación con este y otros propósitos. Algunos ofrecen más ventajas sobre otros y han ganado más popularidad y otros, aunque fueron útiles, hoy son poco utilizados.

Los microsatélites (SSR) son marcadores de ADN cuyos fragmentos se repiten consecutivamente y están distribuidos en todo el genoma. Estos marcadores tienen la propiedad de ser codominantes, esto significa que pueden revelar los alelos aportados por ambos padres en las cruces genéticas (Kumar et al., 2016). En mango, se han reportado más de 20 trabajos recientes utilizando SSR para evaluar la diversidad genética de germoplasma de colecciones, y para determinar relaciones genéticas entre individuos de distintas poblaciones (Kumar et al., 2016).

Por su parte, los marcadores moleculares RAPD's consisten en el uso de oligonucleótidos cortos para la iniciación de las reacciones de amplificación al azar por PCR, discriminan entre individuos diferentes, con la presencia o ausencia de fragmentos amplificados (Salvador-Figueroa et al., 2008). Su utilidad en mango fue en la determinación de relaciones entre individuos con o sin parentesco, y en la diversidad genética en poblaciones o colecciones. A partir de su desarrollo, fueron herramientas ampliamente utilizadas, hoy son escasamente empleadas, pero hasta 2012 se reportan unos 18 trabajos en mango (Samal et al., 2012).

Por su parte, los AFLPs (polimorfismo en los fragmentos amplificados), son marcadores multi-locus que analizan regiones distribuidas en todo el genoma y que consisten en digerir el ADN genómico, empleando enzimas de restricción y PCR selectiva de los fragmentos obtenidos, para detectar polimorfismos en posibles mutaciones en la secuencia de ADN, o cerca de los sitios de restricción (Vos et al., 1995). En mango se ha empleado para estimar relaciones genéticas entre individuos, diversidad genética entre poblaciones (Eiadthong et al., 1999; Gálvez-López et al., 2010a), y para construir mapas genéticos (Kashkush et al., 2001).

Por otro lado, existen los marcadores moleculares SNPs (polimorfismo de un solo nucleótido), los cuales se han utilizado en mango para determinar diversidad genética, relaciones de parentesco entre individuos genéticamente cercanos, para establecer relaciones de origen, post-domesticación, para detectar variaciones genómicas (Kuhn et al., 2016).

En México se han realizado pocos estudios del germoplasma de mango empleando marcadores moleculares. Por ejemplo, se analizó la variación molecular entre individuos del huerto padre de mango Ataulfo en Chiapas, empleando marcadores moleculares RAPD, encontrando 93.7% de similitud entre los ocho individuos (Salvador-Figueroa et al., 2008). En otros estudios se caracterizaron genotipos de mango criollos de Chiapas, México, empleando marcadores moleculares AFLP; los autores encontraron diferencias genéticas entre accesiones criollas y variedades cultivadas, respecto a las variedades provenientes del banco de germoplasma de Cotaxtla, Veracruz (Gálvez-López et al., 2010a).

Así también, se evaluó la diversidad y relación genética entre accesiones de mango distribuidas geográficamente en 16 estados de México, empleando marcadores AFLP y SSR, respectivamente; ambos marcadores coincidieron en la formación de dos grupos de mango, una incluyó mangos de la costa del Golfo de México y la otra, mangos de la costa del Océano Pacífico; también encontraron que los estados que presentaron mayor variabilidad genética poblacional fueron, Oaxaca, Michoacán y Tabasco (Gálvez-López et al., 2010a). Aunque los estudios han sido generales (Figura 1) y muestran características genéticas importantes, aún no aterrizan del todo en un programa de mejoramiento genético, por lo que hay bastante trabajo por realizar, sobre todo en México. Por ejemplo, existen métodos para determinar las relaciones del genotipo con el fenotipo que aún no se aplican en mango mexicano. Primeramente es necesario caracterizar el fenotipo de cada individuo de interés, que incluye la productividad y regularidades de frutos, las características fisicoquímicas, sensoriales, bioquímicas y fisiológicas del fruto, entre otras (Gálvez-López et al., 2007). Posteriormente, la caracterización del genotipo se realiza empleando las herramientas moleculares mencionadas, además de secuenciación, mapeo genético, entre otros (Wang et al., 2020a). Luego, a través de métodos de correlación estadística, de análisis de caracteres cuantitativos (QTL's) o de análisis de genes candidatos, se puede determinar la asociación de los caracteres fenotípicos con los moleculares, como se ha logrado en otros frutales. Así se podría determinar qué genotipos son los potenciales portadores de características fenotípicas de interés (Kuhn et al., 2019). Con esta información generada, se podrían proponer cruza dirigidas y obtener individuos potenciales en los programas de mejoramiento genético del mango en el país (Kumar et al., 2016; Samal et al., 2012).

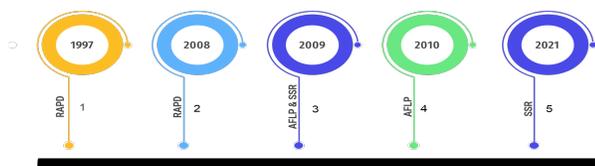


Figura 1. Línea de tiempo sobre estudios con marcadores moleculares en México. 1 (López-Valenzuela et al., 1997), 2 (Salvador-Figueroa et al., 2008), 3 (Gálvez-López et al., 2009), 4 (Gálvez-López et al., 2010a), 5 (De la Cruz-Marcial, et al., 2021).

3. Avances genómicos en mango

En *M. indica* los estudios genómicos han avanzado, ya que la meta es mejorar los cultivos o variedades comerciales existentes, y elegir apropiadamente los parentales con características favorables para futuras cruza dirigidas (Kuhn et al., 2016). Se han realizado varios transcriptomas de diferentes tejidos de mango. Pandit et al (2010) aislaron 18 genes relacionados con la bioquímica y la fisiología de la fruta, mismos que fueron candidatos a la expresión en frutos en desarrollo, maduración, flores y hojas, mostrando que la expresión del gen que codifica para la enzima monoesquiterpeno-sintasa, disminuyó durante la maduración.

Azim et al. (2014) realizaron la caracterización del transcriptoma y el análisis del genoma del cloroplasto de mango, revelando 139 genes del genoma cloroplasto, de los cuales, 91 codifican proteínas. El análisis de secuenciación reveló el genoma de cloroplasto *Citrus sinensis* como vecino más cercano del mango.

Se han realizado diferentes transcriptomas del fruto empleado tecnología Illumina RNA-Seq con diferentes variedades comerciales de mango Shelly y Zill, en los cuales se han identificado genes clave, involucrados en los mecanismos potencialmente asociados con la resistencia de la fruta a los patógenos, la mejora del color de la cáscara y el desarrollo de la decoloración de las lenticelas (Luria et al., 2014). También se ha proporcionado la secuencia completa para una vista sistémica del transcriptoma durante el desarrollo del fruto del mango (Wu et al., 2014). Dautt-Castro et al. (2015) emplearon el analizador de Genoma GAIIX II (Illumina) y realizaron un ensamble de *novoo*, del transcriptoma del mesocarpio del mango. Los transcritos se validaron utilizando PCR de transcripción en tiempo real (qRT-PCR), obteniendo como resultado la identificación de unigenes que codifican productos génicos de vías como la transducción de señales de hormonas vegetales, el metabolismo del almidón y la sacarosa, el metabolismo de la galactosa, la biosíntesis del esqueleto terpenoide y la biosíntesis de carotenoides, que dirigen cambios durante la maduración del fruto. Los avances en el estudio del transcriptoma sobre los genes involucrados en procesos de formación y modificación de la cutícula se han realizado en varios frutos como tomate (*Solanum lycopersicum*) (Isaacson et al., 2009). Los órganos vegetativos de *Arabidopsis thaliana* (Isaacson et al., 2009) se han tomado como modelo para realizar el transcriptoma de *Mangifera indica* L., obteniendo como resultado la expresión de genes que participan en la elongación de ácidos grasos y formación de compuestos alifáticos *AtWIN1/SHN1*, *MiWIN1/SHN1* (MIN047952), que codifican para una proteína con un 68% de identidad con *AtWIN1/SHN1* (Tafolla-Arellano et al., 2017). Además de los estudios de transcriptoma de la cáscara del mango, se han ensamblado 107,744 unigenes con una longitud de 184'977,733 pb, valores que han logrado clasificar en diferentes grupos de unigenes de acuerdo a su longitud (Tafolla-Arellano et al., 2017).

Wang et al. (2020a) generaron el primer ensamblaje en el genoma de referencia del mango en el que se proporciona información crucial de manera pública. Se emplearon 20 pseudomoléculas con una capa gruesa etiquetada cada 5 Mb. Estos marcadores genéticos mapeados en el cromosoma de *M. indica* L. proporcionan información en varios sentidos: muestran la densidad de repetición, la densidad de genes, los genes implicados a resistencia de enfermedades, genes asociados con la producción de metabolitos implicados en la pigmentación de cutícula del fruto y otros. Lo anterior facilita la resecuenciación del genoma completo del mango (Wang et al., 2020a).

4. Mapas genéticos de mango (*Mangifera indica* L.)

Dentro de los germoplasmas de mango disponibles es importante identificar características hortícolas deseables para producir poblaciones mejoradas con bases genotípica y fenotípica (Kuhn et al., 2017). Actualmente las herramientas empleadas para el mapeo genético en mango, son los marcadores moleculares, entre ellos SNP, que para su descubrimiento, tienen a su disposición tecnologías de alto rendimiento (microarrays y NGS) mismas que están más disponibles (Cutler et al., 2001; Davey et al., 2013; McCouch et al., 2010). Por lo tanto, en términos de genotipificación paralela, las tecnologías disponibles inclinan la balanza a favor del uso de SNP como marcadores en lugar de SSR u otros, misma que permite la selección de progenitores (Sherman et al., 2015).

Kashkush et al. (2001) crearon el primer mapa genético de *M. indica* de una cruce de las variedades Keitt y Tommy-Atkins con el empleo de 34 marcadores moleculares AFLP en el que se estudió la relación genética de 16 cultivos, y 13 grupos de ligamiento. La construcción del mapa genético se basó en la combinación de fragmentos polimórficos amplificados con un peso promedio de 161.5 cM. Por lo tanto, se han generado mapas genéticos que han ayudado en la localización de regiones cromosómicas que codifican para caracteres de interés frutícola y productivo. Esta herramienta es altamente prometedora, sin embargo, se requiere del uso de individuos provenientes de cruces controladas, los cuales necesitan de al menos cuatro años para evaluar las características de los descendientes (Kashkush et al. 2001). En fecha reciente, un mapa de alta resolución fue producido por Luo et al. (2016), en el que desarrollaron el primer mapa genético de alta densidad empleando marcadores de secuenciación de fragmentos amplificados de locus específicos (SLAF-seq) que se basó en el estudio 173 individuos F1 de la cruce de especies de *M. indica* cv. Jin-Hwang (parental masculino) y cv. Irwin (parental femenino). Ambos parentales conservan caracteres de interés, por ejemplo, resistencia antracnosis en el parental Jin-Hwang, y frutos de color amarillo brillante y tamaño mediano para el parental Irwin. Se mapearon 20 grupos de ligamiento, saturado con 7394 marcadores SLAF.

El mapa genético desarrollado por Kuhn et al. (2017) identificó marcadores y regiones del genoma que se

encuentran asociados a caracteres de interés agronómico, en los que sobresalen, ramificaciones, color de la pulpa, floración y otros (Figura 2). El estudio se realizó en 911 individuos coleccionados de germoplasmas internacionales. Para completar el mapa del mango se emplearon 1,054 marcadores SNP en siete poblaciones híbridas, con un tamaño total de 2,890 cM y el tamaño promedio de 150 Kb. Las pruebas de MapQTL se encontraron siete parámetros cualitativos de los 14 usados, el tipo de embrión fue la característica con mayor puntuación del LOD para el marcador MI_0173 (Kuhn et al., 2017).

5. Conclusión

La presente revisión analizó el estado del arte de estudios de diversidad genética del mango, mapas genéticos de variedades y recursos genómicos disponibles. Se encontró que en los programas internacionales existen avances significativos sobre las herramientas genéticas que se emplean para el mejoramiento genético del mango; sin embargo, los programas de mejoramiento genético avanzan lentamente. Por otra parte, en México no existen programas de mejoramiento genético del mango, aunque hay estudios que evalúan el germoplasma, aún faltan varios estudios de mejoramiento genético empleando herramientas moleculares.

Agradecimientos

Al CONACYT proyecto APN-2017-6427 por el financiamiento para los análisis moleculares de mango (*Mangifera indica* L.) en el Instituto de Biociencias UNACH.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

6. Referencias

- Azim MK, Khan IA, Zhang Y. 2014. Characterization of mango (*Mangifera indica* L.) transcriptome and chloroplast genome. *Plant Molecular Biology* 85(1): 193–208.
- Cheng Z, Huang H. 2009. SSR fingerprinting Chinese peach cultivars and landraces (*Prunus persica*) and analysis of their genetic relationships. *Scientia Horticulturae* 120(2): 188–193.
- Cutler DJ, Zwick ME, Carrasquillo MM, Yohn CT, Tobin KP, Kashuk C, Mathews DJ, Shah NA, Eichler EE, Warrington JA, Chakravarti A. 2001. High-throughput variation detection and genotyping using microarrays. *Genome Research* 11(11): 1913–1925.
- Dautt-Castro M, Ochoa-Leyva A, Contreras-Vergara CA, Pacheco-Sanchez MA, Casas-Flores S, Sanchez-Flores A, Kuhn DN, Islas-Osuna MA. 2015. Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Kent fruit mesocarp *de novo* transcriptome assembly identifies gene families important for ripening. *Frontiers in Plant Science* 6: 62.

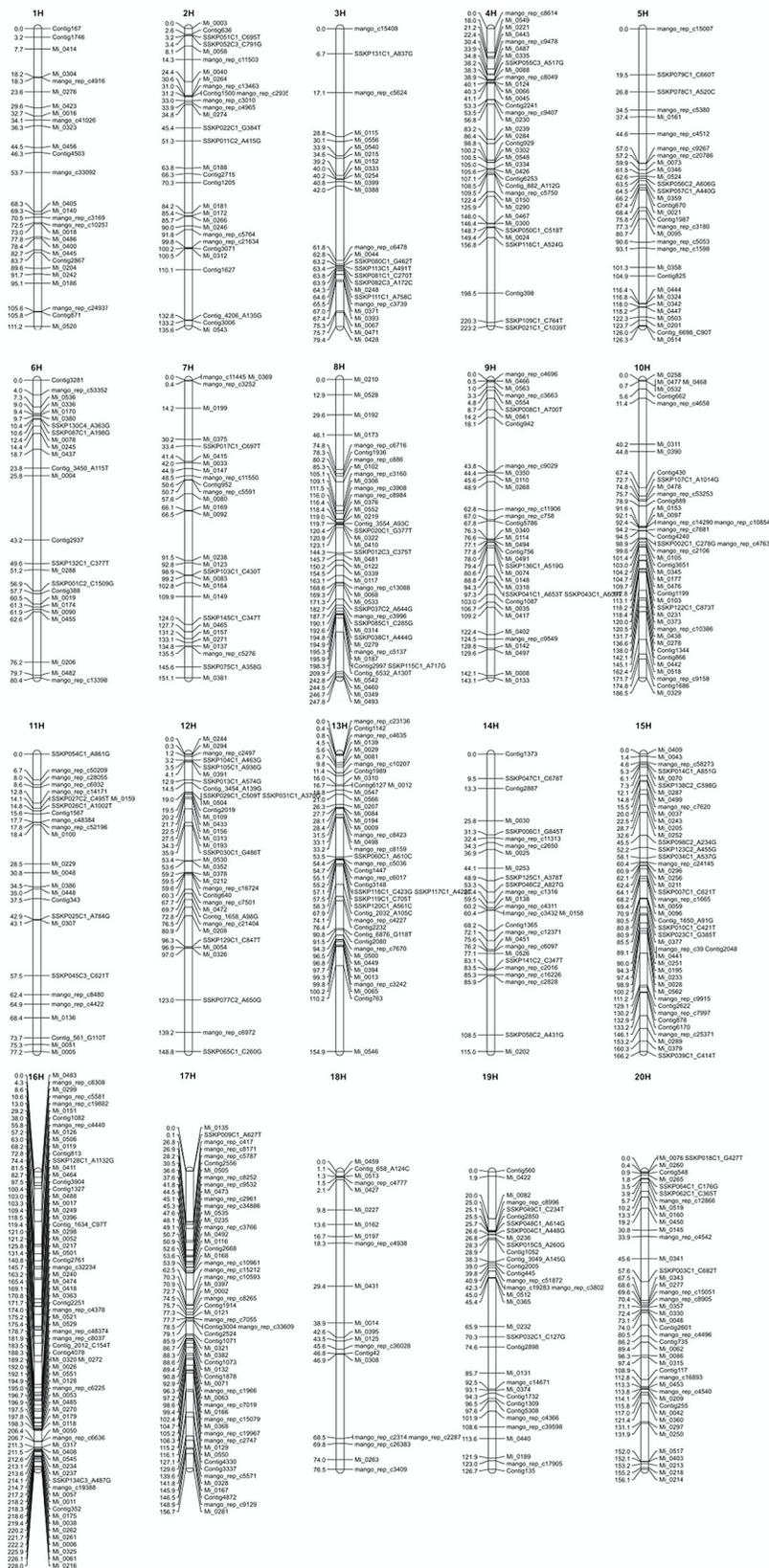
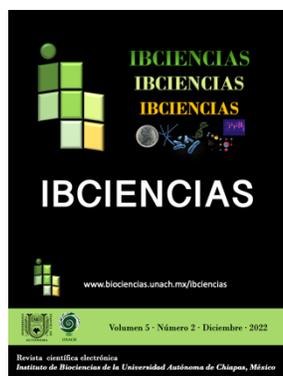


Figura 2. Mapa genético que muestra los 20 grupos de ligamiento del genoma de mango (*M. indica*) saturado con marcadores SNPs. Tomado de Kuhn et al. (2017).

- Davey JW, Cezard T, Fuentes-Utrilla P, Eland C, Gharbi K, Blaxter ML. 2013. Special features of RAD Sequencing data: implications for genotyping. *Molecular Ecology* 22(11): 3151–3164.
- De Souza VAB, Da Costa Lima PS. 2004. Genetic variability in mango genotypes detected by RAPD markers. *Acta Horticulturae* 645: 303–310.
- Eiadthong W, Yonemori K, Sugiura A, Utsunomiya N, Subhadrabandhu S. 1999. Analysis of phylogenetic relationships in *Mangifera* by restriction site analysis of an amplified region of cpDNA. *Scientia Horticulturae* 80(3–4): 145–155.
- Gálvez-López D, Adriano-Anaya ML, Villareal-Treviño C, Mayek-Pérez N, Salvador-Figueroa M. 2007. Diversidad isoenzimática de mangos criollos de Chiapas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 13(1): 71–76.
- Gálvez-López D, Hernández-Delgado S, González-Paz M, Becerra-Leor EN, Salvador-Figueroa M, Mayek-Pérez N. 2009. Genetic analysis of mango landraces from Mexico based on molecular markers. *Plant Genetic Resources* 7(3): 244–251.
- Gálvez-López D, Salvador-Figueroa M, Becerra-Leor EN, González-Paz M, Hernández-Delgado S, Mayek-Pérez N. 2010a. Molecular diversity and genetic relationships of mango germplasm from Chiapas, México. *Agrociencia* 44(8): 907–915.
- Gálvez-López D, Salvador-Figueroa M, Adriano-Anaya MDL, Mayek-Pérez N. 2010b. Morphological characterization of native mangos from Chiapas, Mexico. *Subtropical Plant Science* 62: 18–26.
- Gil L, Arcila A, Achury R, Sanabria M, Arias H, Baquero K. 2013. Guía de campo para la identificación y manejo de enfermedades y plagas en el cultivo de mango. <https://doi.org/10.21930/978-958-740-136-3>
- Hernández-Delgado, S., Becerra-Leor, E. N., González-Paz, M., & Mayek-Pérez, N. (2005). Diversidad genética en germoplasma de mango (*Mangifera* sp.) con marcadores moleculares AFLP 178 Encuentro Nacional de Investigación Científica y Tecnológica del Golfo de México. Altamira, México, 41.
- Isaacson T, Kosma DK, Matas AJ, Buda GJ, He Y, Yu B, Pravitari A, Batteas JD, Stark RE, Jenks MA, Rose JKC. 2009. Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. *Plant Journal* 60(2): 363–377.
- Jaramillo S, Baena M. 2000. Conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. IPGRI, España.
- Karihaloo JL, Dwivedi YK, Archak S, Gaikwad AB. 2003. Analysis of genetic diversity of Indian mango cultivars using RAPD markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78(3): 285–289.
- Kashkush K, Jingui F, Tomer E, Hillel J, Lavi U. 2001. Cultivar identification and genetic map of mango (*Mangifera indica*). *Euphytica* 122(1): 129–136.
- Knudsen H. 2000. Directorio de Colecciones de Germoplasma en América Latina y el Caribe. IPGRI, Roma Italia.
- Kuhn DN, Dillon NL, Innes DJ, Wu LS, Mockaitis K. 2016. Development of single nucleotide polymorphism (SNP) markers from the mango (*Mangifera indica*) transcriptome for mapping and estimation of genetic diversity. *Acta Horticulturae* 1111, 315–322.
- Kuhn DN, Bally ISE, Dillon NL, Innes D, Groh AM, Rahaman J, Ophir R, Cohen Y, Sherman A. 2017. Genetic map of mango: A tool for mango breeding. *Frontiers in Plant Science* 8, 577.
- Kumar K, Srivastav M, Singh S. 2016. Ascertaining hybridity of progenies in mango (*Mangifera indica* L.) using microsatellite (SSR) markers. *Journal of Agriculture and Ecology* 2: 1–10.
- López-Valenzuela J.A., Martínez O., Paredes-López O. 1997. Geographic differentiation and embryo type identification in *Mangifera indica* L. cultivars using RAPD markers. *HortScience* 32: 1105–1108.
- Luo C, Hua-He X, Chen H, Ou SJ, Gao MP, Brown JS, Tondo CT, Schnell RJ. 2011. Genetic diversity of mango cultivars estimated using SCoT and ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 39(4–6): 676–684.
- Luo C, Shu B, Yao Q, Wu H, Xu W, Wang S. 2016. Construction of a high-density genetic map based on a large-scale marker development in mango using specific-locus amplified fragment sequencing (SLAF-Seq). *Frontiers in Plant Science* 7:1310.
- Luria N, Sela N, Yaari M, Feygenberg O, Kobiler I, Lers A, Prusky D. 2014. *De-novo* assembly of mango fruit peel transcriptome reveals mechanisms of mango response to hot water treatment. *BMC Genomics* 15(1): 957.
- Martínez-García PJ, Parfitt DE, Ogundiwin EA, Fass J, Chan HM, Ahmad R, Lurie S, Dandekar A, Gradziel TM, Crisosto CH. 2013. High density SNP mapping and QTL analysis for fruit quality characteristics in peach (*Prunus persica* L.). *Tree Genetics and Genomes* 9(1): 19–36.
- McCouch SR, Zhao K, Wright M, Tung CW, Ebana K, Thomson M, Reynolds A, Wang D, DeClerck G, Ali ML, McClung A, Eizenga G, Bustamante C. 2010. Development of genome-wide SNP assays for rice. *Breeding Science* 60(5): 524–535.
- Pandit SS, Kulkarni RS, Giri AP, Köllner TG, Degenhardt J, Gershenzon J, Gupta VS. 2010. Expression profiling of various genes during the fruit development and ripening of mango. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(6): 426–433.
- Ravishankar KV, Bommisetty P, Bajpai A, Srivastava N, Mani BH, Vasugi C, Rajan S, Dinesh MR. 2015. Genetic diversity and population structure analysis of mango (*Mangifera indica*) cultivars assessed by microsatellite markers. *Trees-Structure and Function* 29(3): 775–783.
- Salvador-Figueroa M, Torres de los Santos R, Ovando-Medina I, Vázquez Ovando JA, Adriano Anaya M. 2008. Análisis de variabilidad genética del huerto padre del mango (*Mangifera indica* Linn.) variedad Ataulfo. *Quehacer Científico en Chiapas* 5: 29-34.
- Samal KC, Jena RC, Swain SS, Das BK, Chand PK. 2012. Evaluation of genetic diversity among commercial cultivars, hybrids and local mango (*Mangifera indica* L.) genotypes of India using cumulative RAPD and ISSR markers. *Euphytica* 185(2): 195–213.
- Sherman A, Rubinstein M, Eshed R, Benita M, Ish-Shalom M, Sharabi-Schwager M, Rozen A, Saada D, Cohen Y, Ophir R. 2015. Mango (*Mangifera indica* L.) germplasm diversity based on single nucleotide polymorphisms derived from the transcriptome. *BMC Plant Biology* 15(1): 277.
- SIAP. 2021. Estadística anual de la producción de mango. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Tafolla-Arellano JC, Zheng Y, Sun H, Jiao C, Ruiz-May E, Hernández-Oñate MA, González-León A, Báez-Sañudo R, Fei Z, Domozych D, Rose JKC, Tiznado-Hernández ME. 2017. Transcriptome analysis of mango (*Mangifera indica*

- L.) fruit epidermal peel to identify putative cuticle-associated genes. *Scientific Reports* 7: 46163.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijmans M, Lee T, van de Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21): 4407–4414.
- Wang P, Luo Y, Huang J, Gao S, Zhu G, Dang Z, Gai J, Yang M, Zhu M, Zhang H, Ye X, Gao A, Tan X, Wang S, Wu S, Cahoon EB, Bai B, Zhao Z, Li Q, Wei J, Chen H, Luo R, Gong D, Tang K, Zhang B, Ni Z, Huang G, Hu S, Chen Y. 2020a. The genome evolution and domestication of tropical fruit mango. *Genome Biology* 21: 60.
- Wang X, Shen F, Gao Y, Wang K, Chen R, Luo J, Yang L, Zhang X, Qiu C, Li W, Wu T, Xu X, Wang Y, Cong P, Han Z, Zhang X. 2020b. Application of genome-wide insertion/deletion markers on genetic structure analysis and identity signature of *Malus accessions*. *BMC Plant Biology* 20(1): 1–13.
- Warschefsky EJ, von Wettberg EJB. 2019. Population genomic analysis of mango (*Mangifera indica*) suggests a complex history of domestication. *New Phytologist* 222(4): 2023–2037.
- Wu H, Jia H, Ma X, Wang S, Yao Q, Xu W, Zhou Y, Gao Z, Zhan R. 2014. Transcriptome and proteomic analysis of mango (*Mangifera indica* Linn) fruits. *Journal of Proteomics* 105: 19–30.



Digestibilidad *in vivo* en tilapia (*Oreochromis niloticus*) de la pasta residual fermentada de semillas de *Jatropha curcas*

Yadira del Carmen López-Martínez¹, Sonia Ruiz-González^{2*}, Isidro Ovando-Medina²

¹Licenciatura de Ingeniero en Sistemas Costeros. Universidad Autónoma de Chiapas. Puerto Madero, Tapachula, Chiapas, México.

²Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

La pasta residual de la semilla de *Jatropha curcas* por ser rica en proteína tiene características nutrimentales los cuales pueden llegar a ser utilizadas para la alimentación de animales; sin embargo, por contener compuestos tóxicos no se aprovecha. La detoxificación mediante fermentación empleando hongos de la misma planta ha dado resultados positivos para reducir o eliminar compuestos tóxicos como ésteres de forbol. La pasta residual fermentada con hongos endófitos puede ser utilizada como alternativa en la alimentación de peces, por esa razón, en el presente estudio se investigó la digestibilidad de la pasta residual como alimento de tilapia *Oreochromis niloticus* en etapa alevín y juvenil. Los resultados mostraron que las dietas a base de la pasta residual fermentada fueron digeridas con mayor facilidad por juveniles de tilapia nilótica. Los valores nutricionales determinados en las dietas utilizadas muestran que la pasta fermentada cumple con los requerimientos para la alimentación de las tilapias ya que muestran valores similares al alimento convencional.

Palabras clave:

Acuicultura
Alimento balanceado
Co-productos
Fermentación sólida
Toxicidad

Keywords:

Aquaculture
Feed balanced
Co-products
Solid fermentation
Toxicity

In vivo digestibility of the fermented residual cake of *Jatropha curcas* seeds using tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Abstract

The residual cake of the *Jatropha curcas* seed is rich in protein, which is why it has nutritional characteristics to be used for animal feeding; however, because it contains toxic compounds, it is not used. The detoxification using fungi by solid-state fermentation have given positive results to remove toxic compounds such as phorbol esters. The residual cake fermented with endophytic fungi can be used as an alternative in feeding fish, for this reason, in the present study the digestibility of the residual paste as food of tilapia *Oreochromis niloticus* in the fingerling and juvenile stage was investigated. The results showed that the diets based on the fermented residual paste were more easily digested by juvenile Nilotic tilapia. The nutritional values determined in the diets used shown that the fermented paste meets the requirements for tilapia feeding, since they show similar values to conventional feed.

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,
Universidad Autónoma de
Chiapas.
Boulevard Príncipe Akishino
sin número, Colonia
Solidaridad 2000, CP.
30798.
Tapachula, Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9626427972.
Correo-electrónico:
sony.ruizgonzalez@gmail.com

1. Introducción

México cuenta con una gran biodiversidad de flora, albergando un alto número de plantas de interés. Una de estas plantas es el piñón (*Jatropha curcas* L.), la cual se distribuye en climas tropicales y semitropicales, y se caracteriza por ser un cultivo apto para ser implantado en suelos marginales, bajo condiciones áridas y semiáridas (Kumar y Sharma, 2008). Es una planta Euphorbiaceae, cuyas semillas poseen elevado contenido de aceite, por lo cual es considerada de alto potencial para cultivo intensivo con fines de producción de biocombustibles (Dharma et al., 2016). Desde el año 2007, se han establecido en el estado de Chiapas al sur de México, alrededor de 1000 ha de este nuevo cultivo, de las cuales en la zona costera se tienen registradas 200 ha plantadas, principalmente en el municipio de Arriaga, Chiapas (Ovando-Medina et al., 2016).

La importancia de este cultivo radica en que el producto primario que se obtiene son sus semillas, las cuales sirven como materia prima para la extracción de aceite, además, es una planta de fácil manejo y rápido crecimiento. El rendimiento promedio es de 3 ton de semilla por ha; de eso solo 1.5 toneladas son de aceite y el resto es de pasta residual. La pasta de *J. curcas* tiene características nutrimentales las cuales pueden llegar a ser utilizadas para la alimentación de animales (Rodríguez-Calle et al., 2016). La pasta residual de *J. curcas* es un subproducto que contiene un elevado valor nutritivo de fibra (15-20%) y proteína (45-55%) (Martínez et al., 2010). Aún con estas características es un subproducto al que no se le está tratando ni aprovechando por contener compuestos tóxicos (ésteres de forbol) y compuestos no nutritivos (lectinas, curcinas, saponinas) (Devappa et al., 2012; Makkar et al., 1997).

Como alternativa se ha propuesto la detoxificación de la pasta residual utilizando diversos métodos, los cuales tienen como fin degradar los compuestos tóxicos presentes en productos vegetales. Los métodos de detoxificación se pueden basar en procesos térmicos, químico-enzimáticos y/o fermentativos con resultados parcialmente exitosos en la remoción o inactivación de compuestos tóxicos (López et al., 2006; Zhang et al., 2016).

Diversos estudios mencionan que la detoxificación biológica es una alternativa biotecnológica que disminuye los factores no nutritivos y compuestos tóxicos de la pasta de *Jatropha*. Phengnuam y Suntornsuk (2013) utilizaron dos cepas de *Pseudomonas* para detoxificar el residuo de la pasta residual de *J. curcas*, como resultado encontraron que *Bacillus licheniformis* logró disminuir 62% la concentración de ésteres de forbol mediante fermentación sumergida. Veerabhadrapa et al. (2014) utilizaron una cepa de *Aspergillus versicolor* CJS-98 en fermentación sólida para optimizar lipasas, proteasas y detoxificar la pasta residual de *J. curcas*. Como resultado encontraron que los ésteres de forbol se redujeron de 0.083% a 0.015%.

En otro estudio, Flores-Chilel et al. (2020) detoxificaron la pasta residual de semillas de *J. curcas* con hongos endófitos aislados de la misma planta; obtuvieron una pasta de baja

toxicidad y presentó más contenido de proteína soluble con el tratamiento inoculado con los hongos *Penicillium* sp. y *Nigrospora* sp.

Por otro lado, Solomon et al. (2016) evaluaron el crecimiento de los alevines de *Clarias gariepinus* alimentados con harina de *J. curcas* detoxificada químicamente como un sustituto de la harina de pescado, los resultados que obtuvieron al final de ocho semanas en cuanto a la ganancia de peso y la tasa de crecimiento fueron mayores en los peces alimentados con un nivel de inclusión del 13% de *J. curcas* que indica hasta un 50% de sustitución de la harina de pescado sin afectar el crecimiento y la utilización de nutrientes de manera significativa.

Wang et al. (2013) detoxificaron la pasta residual de *J. curcas* con una nueva cepa de *Streptomyces fimicarius*. La pasta fermentada en estado sólido no fue tóxica para plantas y alevines de carpa y promovieron significativamente el crecimiento de la planta de tabaco, por lo que sugieren que además de usarlo para alimentación de animales puede ser utilizado como fertilizante orgánico.

Aunque la pasta sea detoxificada, se desconoce su digestibilidad con miras a su uso como alimento de peces. Por consiguiente, el objetivo del trabajo fue evaluar la digestibilidad de la pasta residual fermentada de semillas de *Jatropha curcas* en mojarra tilapia (*Oreochromis niloticus*).

2. Materiales y métodos

Se utilizó harina desgrasada de semillas de *J. curcas* de la accesión MAP-08 para la fermentación en estado sólido de pasteles de 40 g, inoculando esporas de dos hongos endófitos, *Penicillium* sp. CDCU-3 y *Nigrospora* sp. CHIC-1 (1×10^9 esporas de hongo en agua estéril suficiente para alcanzar 50% de humedad, determinado gravimétricamente). La incubación se hizo en bolsas herméticas Ziploc® durante 10 d a 28 °C. Una vez crecidos los hongos, los fermentados se guardaron en refrigeración.

Se realizó la preparación del alimento mezclando pasta residual con otros componentes que son utilizados para la dieta de la tilapia y el marcador inerte óxido de cromo (Bremer-Neto et al., 2005). Para la obtención de los *pellets* se utilizó el molino de carne donde se obtuvo cilindros de 0.50 mm, posteriormente fueron secados por 24 h a 40 °C y almacenados hasta su uso.

2.1. Caracterización química del alimento

Los análisis químicos del alimento fueron realizados siguiendo los métodos sugeridos por AOAC (1997). Así se determinaron el contenido de humedad, lípidos por el método de Soxhlet (James et al., 1999), cenizas mediante calcinación en la mufla, proteínas por el método de Kjeldahl y carbohidratos totales siguiendo el método de Dubois et al. (1956).

2.1.1. Humedad

Se determinó por el método de gravimetría usando el secado en horno para lo cual, se registró el peso constante de los crisoles y se les agregó 1 ± 0.05 g de muestra. Después se

colocaron los crisoles en el horno a 105 °C durante 24 h, transcurrido ese tiempo, se enfriaron en el desecador y se tomó el peso del crisol con la muestra seca. Se estimó la humedad (H) aplicando la fórmula, $H (\%) = \frac{((C+MH) - (C+MS))}{((C+MH)-C)} * 100$. Donde, C: crisol, MH: muestra húmeda, MS: muestra seca.

2.1.2. Cenizas

Se determinó por el método de calcinación en mufla, para lo cual se utilizaron las muestras secas provenientes del análisis de humedad. Se calcinaron las muestras a 550 °C, durante 4 h, se enfriaron en desecador y se pesaron. Se calculó el contenido de cenizas a través de, $C (\%) = \frac{(\text{crisol mufla} - \text{crisol vacío})}{(\text{crisol muestra} - \text{crisol vacío})} * 100$.

2.1.3. Proteína

Se determinó por el método de Kjeldahl. Inicialmente se pesó 0.5 g de muestra, se colocó la muestra en un tubo donde se añadió 2 g de catalizador y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado para digestión a 420 °C durante 60 min. Posteriormente se añadió 80 mL de agua destilada y 50 mL de NaOH al 40%. A continuación, se destiló la muestra recibiendo el destilado en 25 mL de ácido bórico al 4% hasta que alcanzó un volumen de 100 mL y viró a color verde. Finalmente, se titularon las muestras con una solución de HCl valorada hasta viraje a color rosa claro. Se calculó el porcentaje de proteína considerando 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína, utilizando la ecuación, $\text{Prot} (\%) = \frac{(\text{mL HCl muestra} - \text{mL HCl blanco}) * N \text{ HCl} * \text{meq N} * 6.25}{\text{peso muestra}} * 100$.

2.1.4. Carbohidratos totales

Primeramente, se maceraron 50 mg de muestra en 50 mL de agua destilada, de donde se transfirió 1 mL de la suspensión a un tubo de ensayo de 13 x 100 y se adicionó 0.6 mL de una solución acuosa de fenol al 5%. Se mezcló y se añadió 3.6 mL de ácido sulfúrico concentrado. Dicha mezcla se dejó 30 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 480 nm. Se estimó el contenido de azúcares, en porcentaje, a partir de una curva patrón de glucosa preparada en el intervalo 0-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.2. Material biológico

2.2.1. Alevines

Se evaluó la sobrevivencia, talla y peso de alevines de tilapia (*O. niloticus*) iniciando con un peso de 0.1 g. Se tuvieron 3 tratamientos con tres repeticiones bajo un diseño completamente al azar, con 20 organismos por repetición o unidad experimental. Durante el periodo experimental se instalaron 9 unidades experimentales con capacidad de 20 L. En cada unidad experimental la temperatura se mantuvo constante 26 °C.

2.2.2. Juveniles

Se utilizaron juveniles con peso de 20 g, a los cuales se evaluaron sobrevivencia peso y talla. Se tuvieron 3 tratamientos con tres repeticiones bajo un diseño completamente al azar, con 20 organismos por repetición o unidad experimental. Durante el periodo experimental se instalaron 9 unidades experimentales con capacidad de 60 L.

En cada unidad experimental la temperatura se mantuvo constante 26 °C.

2.2.3. Alimentación y recolección de heces

Previo al inicio del bioensayo, los peces fueron dejados en ayuno durante 5 días, con el objetivo de vaciar completamente el sistema digestivo del pez. La alimentación fue *ad libitum* tres veces al día con alimento balanceado convencional, dieta a base de pasta residual fermentada o con dieta a base de pasta no fermentada (6:00 am, 10:00 am y 1:00 pm), durante 21 d. Diariamente se sifoneó 30 min después de la última alimentación para extraer el alimento sobrante, se recolectaron las heces a las 6:00 pm. La materia fecal colectada, se enjuagó con agua y se almacenó hasta su análisis. Para la determinación del porcentaje de digestibilidad aparente se utiliza las siguiente formulas (Furukawa et al., 1966), Digestibilidad aparente de materia seca (DAMS) = $100 - [100 * (\% \text{ óxido de cromo en dieta} / \% \text{ óxido de cromo en heces})]$; digestibilidad aparente del nutriente (DAN) = $100 - [100 * ((\% \text{ óxido de cromo en dieta} / \% \text{ N en dieta}) (\% \text{ N en heces} / \% \text{ óxido de cromo en heces}))]$. Estas determinaciones se denominan “aparentes” porque no se ha corregido la posible interferencia que involucra la excreción de materia fecal de origen endógeno (descamación de las células digestivas, enzimas secretadas en el lumen, bacterias). La concentración de Cr_2O_3 se determinó por el método de digestión ácida (Furukawa et al., 1966). El porcentaje de nutriente en alimentos y heces se obtuvo mediante la determinación de proteína con el método de Lowry, para lo cual se realizó la extracción con buffer PBS (Lowry et al., 1951).

2.3. Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de la varianza, y donde se encontraron diferencias se aplicó la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), con el programa XLStat Profesional versión 2011.

3. Resultados

3.1. Análisis proximal

Los resultados del análisis proximal de la pasta fermentada (PF), la pasta no fermentada (PNF) y alimento convencional (AC) se muestran en el Cuadro 1. La pasta fermentada y el alimento convencional tienen valores similares (diferencia entre 0.6 a 1%) en los parámetros analizados, la pasta no fermentada es la que presentó diferencias en cada uno de los valores que se obtuvieron, siendo menores entre 6 (humedad) al 15% (proteína). Después de realizar los análisis proximales de las pastas se implementó el experimento en dos fases, alevines y juveniles, de acuerdo con lo establecido en la sección de materiales y método.

3.2. Alevines

La tasa de sobrevivencia de alevines se muestra en la Figura 1. El AC mantuvo 95% de sobrevivencia final durante el experimento. Los tratamientos PF y PNF, mostraron un comportamiento similar de disminución en la tasa de

sobrevivencia, la PNF presentó a partir del día 2 y hasta el día final 45% de sobrevivencia, mientras que PF a partir del día 2 hasta el día 10 mostró el 60% en la tasa de sobrevivencia.

Cuadro 1. Valores proximales de la Pasta Fermentada, Pasta No Fermentada y Alimento Convencional.

	Humedad (%)	Proteína (%)	Ceniza (%)	Grasa (%)
Pasta fermentada	11	39	7.8	3.40
Pasta no fermentada	4	24	8.1	2.80
Alimento convencional	11	40	--	4.00

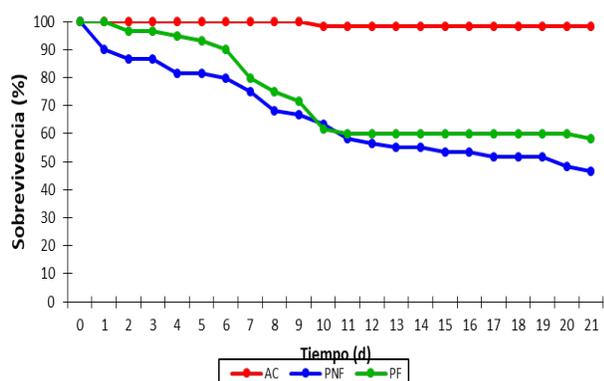


Figura 1. Porcentaje de sobrevivencia de alevines sometidos a los diferentes tratamientos AC: alimento convencional, PF: pasta fermentada, PNF: pasta no fermentada.

Las ganancias entre los pesos establecidos en los diferentes tratamientos con alevines se observan en la Figura 2. Los alevines alimentados con el AC mostraron mayores ganancias en peso, siendo 3 veces más que las diferencias de los alevines alimentados con PF y 5 veces más que las de PNF, siendo esta última la de menores variaciones de peso.

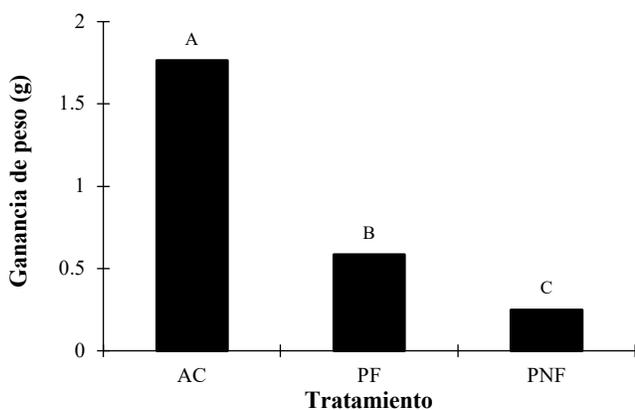


Figura 2. Peso entre los diferentes tratamientos establecidos con alevines. AC: alimento convencional, PF: pasta fermentada, PNF: pasta no fermentada. Letras iguales no hay diferencias significativas ($\alpha=0.05$).

En la Figura 3 se muestran los diferenciales de longitud en los diferentes tratamientos en alevines. Hubo diferencias significativas entre los tratamientos, siendo el AC quien presenta el mayor diferencial en la longitud de los alevines tratados siendo 2 veces mayor que las presentadas por PF y 3 veces más que las presentadas, por PNF, siendo estas últimas quienes presentaron un menor tamaño.

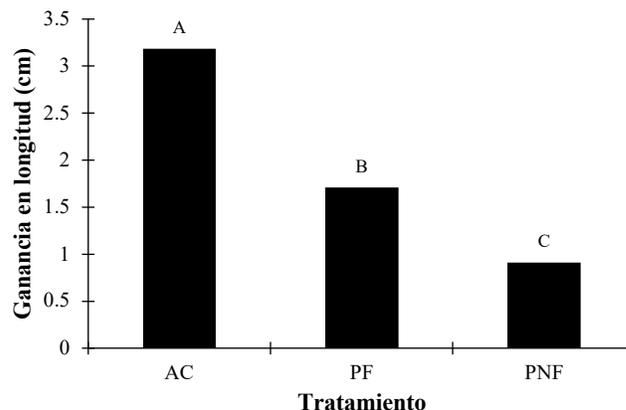


Figura 3. Longitud entre los diferentes tratamientos establecidos con alevines. AC: alimento convencional, PF: pasta fermentada, PNF: pasta no fermentada. Letras iguales no hay diferencias significativas ($\alpha=0.05$).

3.2.1. Digestibilidad aparente

En la etapa de alevines el Coeficiente de Digestibilidad Aparente de Proteína (CDAP), mostró diferencias significativas entre los tratamientos establecidos, esto se observa en la Figura 4. AC (90%) presentó mayor porcentaje de CDAP siendo más de 2 veces el porcentaje presentado por la PNF (40%), y apenas superior al presentado por la dieta PF (85%). El CDAP de PF fue mayor que la PNF, aunque no alcanzó a ser igual a valor de AC.

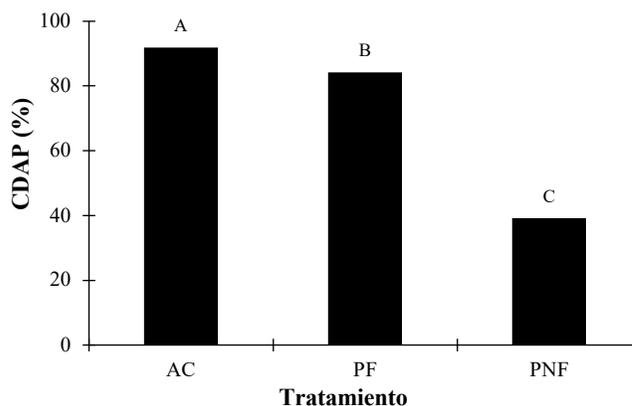


Figura 4. Coeficiente de Digestibilidad Aparente de Proteína (CDAP) en la etapa de alevines, en los diferentes tratamientos establecidos. AC: alimento convencional, PF: pasta fermentada, PNF: pasta no fermentada. Letras iguales no hay diferencias significativas ($\alpha=0.05$).

En el coeficiente de digestibilidad de materia seca (CDMS) no se observó diferencia entre los tratamientos de PF y AC, pero si hubo diferencia con respecto a PNF (Figura 5).

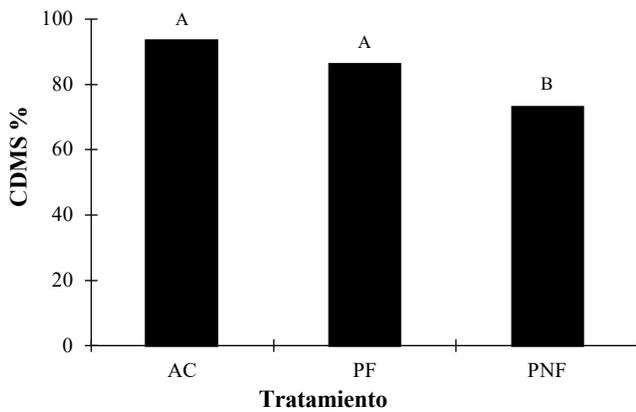


Figura 5. Coeficiente de Digestibilidad de Materia Seca (CDMS) en la etapa de alevines, en los diferentes tratamientos establecidos. AC: alimento convencional, PF: pasta fermentada, PNF: pasta no fermentada. Letras iguales no hay diferencias significativas ($\alpha=0.05$).

3.3. Juveniles

La sobrevivencia en los juveniles de *O. niloticus* se presenta en la Figura 6. Se muestra que, para la PNF, no hubo sobrevivientes después del primer día de alimentación por lo que posteriormente solo se tomaron en cuenta AC y PF para los siguientes análisis, mientras que para AC y PF del primer día y el cuarto día hubo muerte de los peces, manteniéndose en ambos casos por encima del 50% de sobrevivencia.

Los valores encontrados para los tratamientos AC y PF, no mostraron diferencias significativas ($P>0.05$) con respecto a la ganancia de peso (Figura 7) ni con respecto a la longitud de los juveniles de *O. niloticus* (Figura 8).

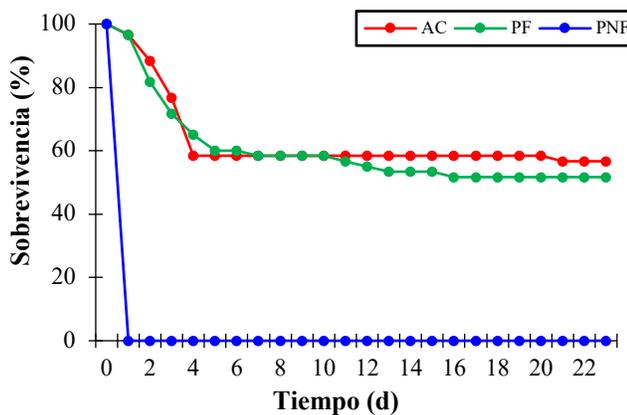


Figura 6. Porcentaje de sobrevivencia de juveniles en los diferentes tratamientos. AC: Alimento Convencional, PF: Pasta Fermentada.

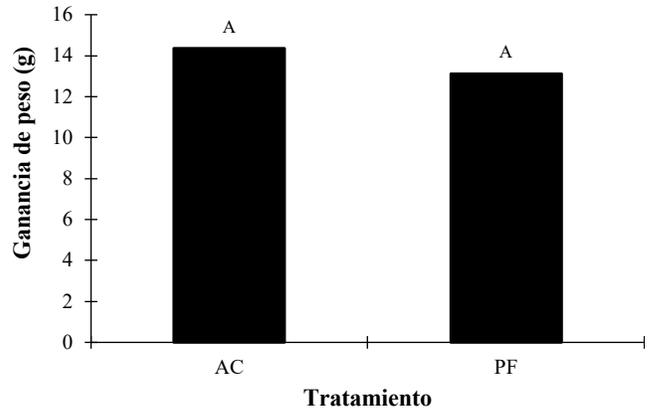


Figura 7. Diferencias de peso de juveniles en los diferentes tratamientos. AC: Alimento Convencional, PF: Pasta Fermentada. Letras iguales no hay diferencias significativas ($\alpha=0.05$).

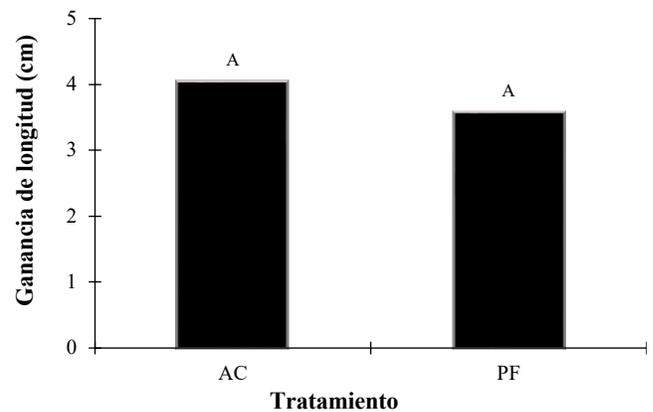


Figura 8. Diferencias de longitud entre los diferentes tratamientos establecidos con juveniles. AC: Alimento Convencional, PF: Pasta Fermentada. Letras iguales no hay diferencias estadísticas ($\alpha=0.05$).

3.3.1. Digestibilidad aparente

En la etapa de juveniles, el CDAP no mostró diferencia entre los tratamientos del alimento convencional y la pasta fermentada (Figura 9) siendo en ambos tratamientos del 90%.

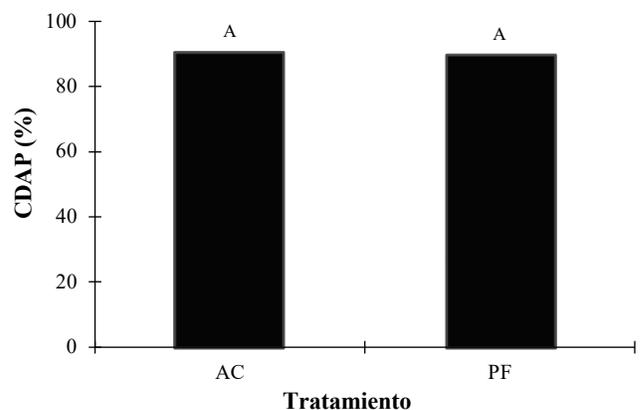


Figura 9. Coeficiente de digestibilidad aparente en la etapa de juveniles en los tratamientos alimento convencional (AC) y pasta fermentada (PF) de *J. curcas*. Letras iguales no hay diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

Para el CDMS en la etapa de juveniles se observó diferencias significativas entre los tratamientos establecidos ($P < 0.05$), AC presentó el mayor porcentaje (75%) mientras que el valor de PF fue 15% menor.

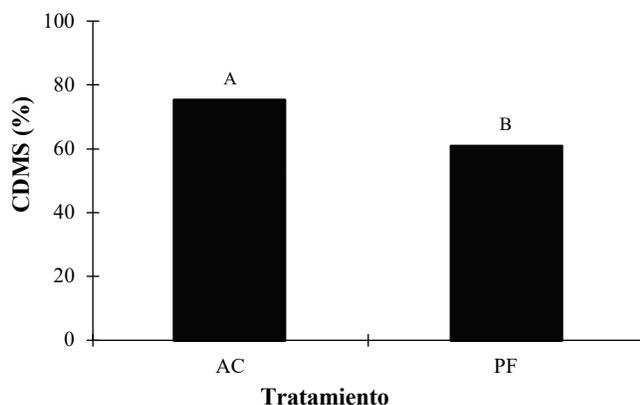


Figura 10. Coeficiente de Digestibilidad de Materia Seca (CDMS) en la etapa de juveniles, en los diferentes tratamientos establecidos. AC: Alimento Convencional, PF: Pasta Fermentada. Letras iguales no hay diferencias estadísticas ($\alpha = 0.05$).

4. Discusión

Los valores nutricionales determinados en las dietas utilizadas demuestran que la PF cumple con los requerimientos para la alimentación de las tilapias, ya que muestran valores similares al AC, las diferencias de PF con respecto a la PNF, revelan el efecto de la fermentación realizada con el hongo, y a esto se debe el aumento en el contenido proteico. Los resultados son similares a lo reportado por algunos autores, donde utilizaron diferentes cepas de hongo y diferentes sustratos como el frijol (Reyes-Fernández et al., 2008), garbanzo (Cuevas-Rodríguez et al., 2006; Paredes-López et al., 1991).

Los valores nutricionales determinados en las dietas utilizadas (Cuadro 1), muestran que la PF cumple con los requerimientos para la alimentación de las tilapias tomando en cuenta las especificaciones mencionadas por Hilton (1983), quien dice que las tilapias con peso de 0.5 a 10 g requieren alimentos con 30-45% de proteína para su crecimiento. Sin embargo, en la sobrevivencia de los alevines se obtuvo una diferencia de 40% entre PF y AC (Figura 1), lo que indica que existe un componente de la PF que afectó la sobrevivencia de los alevines, de igual manera el tamaño y peso con respecto al AC (Figuras 2 y 3). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Puello-Cruz et al. (2013), quienes encontraron una sobrevivencia mayor (73.3 a 83.3%), mayor ganancia en peso y talla (11-16.3 g y 8.7-9.3 cm, respectivamente). Los autores sustituyeron el aceite de pescado por aceite de *J. curcas* y, mencionan que a mayor concentración de harina de *J. curcas* hay baja sobrevivencia y que con un 25% de sustitución de aceite de pescado por aceite de *J. curcas* hay mayor sobrevivencia. Por otro lado, García-Urías (2012) señala que con harina de *J. curcas*

tratada con hexano, presenta 38.9% de mortandad, por lo que sugiere incluir la pasta de harina de *J. curcas* hasta 25%. Nuestro estudio incluyó la extracción del aceite con hexano y 100% de harina de *J. curcas* y la fermentación con *Penicillium* sp. CDCU-3 y *Nigrospora* sp. CHIC-1 reportado previamente (Flores-Chilel et al., 2020).

La digestibilidad del contenido proteico de las pastas coincide con lo reportado con otros autores donde señalan que la pasta desengrasada concentra la proteína. La digestibilidad aparente de materia seca (CDMS) y de proteína (CADP) son dos parámetros indicativos de la cantidad de materia seca y proteína del alimento que son digeridas y absorbidas por los organismos (Brunson et al., 1997). En este sentido, en la CDAP durante la etapa de alevines se observó diferencia significativa ($P < 0.05$) entre diferentes nutrientes en las diferentes dietas, aunque los valores encontrados del 80%, son relativamente bajos en comparación con los obtenidos por Jimoh et al. (2010), aunque ellos utilizaron *Cannavalia ensiformis*. Silva et al. (2013) también obtuvieron valores más altos en los CDAP con diferentes ingredientes. Puello-Cruz et al. (2013) encontraron que el CDA con harina de *Jatropha* sin proceso térmico o purificación varió desde 61% hasta un 80.4%. Algunos autores señalan que la calidad de la proteína de los ingredientes es el principal factor que afecta el rendimiento y su digestibilidad. La pequeña variación observada puede atribuirse a diferencias en las metodologías empleadas para la determinación de los coeficientes, la variabilidad de nutrientes, así como diferencias en el procesamiento de nutrientes, procesamiento de las dietas, la metodología experimental, tamaño de los peces y técnica de muestreo de heces (Jaucey et al., 1983).

En la etapa de juveniles, se encontró 52% de sobrevivencia, en contraste con lo reportado por García-Urías (2012) donde reporta 98% en el crecimiento y un peso máximo de 10 g con la harina de *J. curcas* al 50%, siendo esta la concentración recomendada. Puello-Cruz et al. (2013) reportan sobrevivencias de juveniles entre 90 y 100%, con mezclas de harina (15, 65 y 90%) y aceite (25 y 100%) de *J. curcas* y harina (10, 35, 85%) y aceite (75 y 100%) de pescado; encontraron que hay mayor ganancia de peso y talla en los tratamientos donde hay menos del 65% de harina de *J. curcas*, esto se lo atribuyeron al proceso de masculinización y el tratamiento térmico que le dieron a la harina. En nuestro estudio se utilizó 100% de PF adicionado con aceite de pescado. García-Urías (2012) midió el factor de conversión alimenticia en bioensayo de juveniles de tilapia mostrando que la harina de *J. curcas* obtuvo el mayor factor de conversión alimentaria.

De Barros et al. (2011) señalan que los hongos de pudrición blanca ayudan a disminuir la concentración de los esteres de forbol de *J. curcas*, que podrían ser utilizados potencialmente como un enfoque para el tratamiento de la harina de semillas oleaginosas. De manera similar, nosotros aquí reportamos que las cepas *Penicillium* sp. CDCU-3 y *Nigrospora* sp. CHIC-1 tienen capacidad para detoxificar la pasta residual

obtenida del proceso de extracción de aceite de las semillas de dicha planta. Lo anterior se demuestra en la etapa juvenil donde la PF no afectó el crecimiento de los peces.

La digestibilidad de los ingredientes en la alimentación se considera uno de los factores más importantes que afectan el crecimiento de los peces (De Silva et al., 1995). El coeficiente de digestibilidad de la proteína bruta del alimento basado en harina de pescado tuvo 85.2% de digestibilidad de proteína, y el CDAP en la etapa juvenil, no presentó diferencias significativas tanto en AC y PF ($P > 0.05$), ya que en ambos casos presentaron un valor del 90%. Puello-Cruz et al. (2013) observaron como el tratamiento térmico aumentó la CDA (77.89 a 83.43% vs 61.1 a 80.4%) con respecto al tratamiento no térmico usado y señalan que el aceite de *J. curcas* puede sustituir al aceite de pescado sin presentar diferencias estadísticas. El diferencial del CDMS entre los tratamientos establecidos en el presente estudio puede deberse a la naturaleza de la harina de *J. curcas* la cual contiene menos carbohidratos.

4. Conclusión

La harina de *Jatropha curcas* fermentada con hongos *Penicillium* sp. CDCU-3 y *Nigrospora* sp. CHIC-1, no fue digerible por alevines de tilapia nilótica, sin embargo, en la etapa de juveniles, la digestibilidad de proteínas fue muy similar al alimento convencional. Lo anterior indica que puede utilizarse como sustituto de la harina de pescado en esta etapa. Se recomienda realizar otros estudios con diferentes porcentajes de inclusión de la pasta fermentada y la pasta no fermentada, así como la posibilidad de realizar la incorporación de diferentes porcentajes del aceite de *Jatropha curcas*. Puede también evaluarse el proceso térmico (cocción) de las harinas para aumentar la disponibilidad de nutriente y la eliminación de elementos no nutricios.

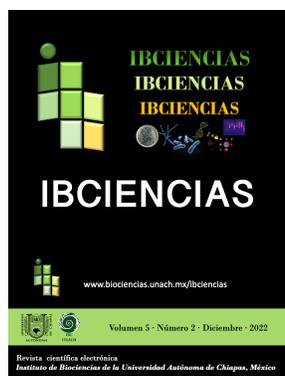
Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias

- Anderson RA, Conway HF, Griffin EL. 1969. Gelatinization of corn grits by role and extrusion cooking. *Cereal Science Today* 14: 11-12.
- AOAC. 1997. Official Methods of Analysis; Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, USA.
- Bremer-Neto H, Graner CAF, Pezzato LE, Padovani CR. 2005. The spectrophotometric method on the routine of 1,5-diphenylcarbazide was adjusted on chromium determination in feces, after its utilization has a biological marker as chromium (III) oxide. *Ciencia Rural* 35: 691-697.
- Brunson JF, Romaine RP, Reihg RC. 1997. Apparent digestibility of selected ingredients in diets for white shrimp *Penaeus setiferus* L. *Aquaculture Nutrition* 3: 9-16.
- Cuevas-Rodríguez EO, Verdugo-Montoya NM, Angulo-Bejarano PI, Milán-Carrillo J, Mora-Escobedo R, Bello-Pérez LA, Garzón-Tiznado JA, Reyes-Moreno C. 2006. Nutritional properties of tempeh flour from quality protein maize (*Zea mays* L.) *LWT* 39: 1072-1079.
- Devappa RK, Makkar HP, Becker K. 2012. Phytochemicals in *Jatropha* seeds and potential agro-pharmaceutical applications of *Jatropha curcas* phorbol esters in *Jatropha*. In: Carels N, Sujatha M, Bahadur B. (Eds). *Challenges for a New Energy Crop*. Springer, New York. Pp. 383-402.
- Dharma S, Masjuki HH, Ong HC, Sebayang AH, Silitonga AS, Kusumo F, Mahlia TMI. 2016. Optimization of biodiesel production process for mixed *Jatropha curcas*-*Ceiba pentandra* biodiesel using response surface methodology. *Energy Conversion and Management* 115: 178-190.
- De Silva SS, Anderson TA. 1994. *Fish Nutrition in Aquaculture* (Vol. 1). Springer Science & Business Media. 319 p.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Flores-Chilel TJ, Adriano-Anaya ML, Ovando-Medina I, Ruiz-González S. 2020. Detoxificación de la torta residual de *Jatropha curcas* L. mediante hongos endófitos. *IBCENCIAS* 3(1): 7-16.
- Furukawa H, Tsukahara H. 1966. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish fed. *Nippon Suisan Gakkaishi* 32: 502-506.
- García-Urías EG. 2012. Ensilado de pescado adicionado con pasta de *Jatropha curcas* no tóxica como alternativa para la alimentación de tilapia (*Oreochromis niloticus*). Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Sinaloa, México.
- Hilton JW. 1983. Potential of freeze-dried worm meal as a replacement for fish meal in trout diet formulations. *Aquaculture* 32: 277-283.
- James CS. 1999. *Analytical Chemistry of Foods*. Second Edition, ASPEN Publishers. New York.
- Jaucey K, Tacon G, Jacson AJ. 1983. The quantitative essential amino acid requirements of *Oreochromis mossambicus*. In: Fishelson L, Yaron Z. (Eds). *International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. 1st Proceedings, Nazareth, Israel. Tel Aviv University, Israel. Pp. 328-337.
- Jimoh WA, Fagbenro OA, Adeparusi EO. 2010. Digestibility coefficients of processed jackbean meal *Cannavalia ensiformis* (L.) DC for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) diets. *International Journal of Fisheries and Aquaculture* 2(4): 102-107.
- Kumar A, Sharma S. 2008. Evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.). A review. *Industrial Crops and Products* 28: 1-10.
- López CA, Gil A, Bello J. 2006. Alimentos con sustancias tóxicas de origen natural: Plantas superiores alimenticias. In: Cameán A, Repetto M. (Eds). *Toxicología Alimentaria* 1st ed. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, Spain. Pp. 191-210.
- Lowry OH, Roserbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Makkar HPS, Becker K, Sporer F, Wink M. 1997. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 3152-3157.

- Martínez J, Martínez AL, Makkar HPS, Francis G, Becker K. 2010. Agroclimatic conditions, chemical and nutritional characterization of different provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *European Journal of Scientific Research* 39: 396-407.
- Ovando-Medina I, Adriano-Anaya ML, Salvador-Figueroa M. 2016. El Piñón (*Jatropha curcas* L.): Recurso vegetal de usos múltiples. Trillas, México.
- Paredes-López O, Harry GL, González-Castañeda J. 1991. Sensory evaluation of tempeh produced by fermentation of common beans. *Journal of Food Science* 55: 123-126.
- Phengnuam T, Suntornsuk W. 2013. Detoxification and anti-nutrients reduction of *Jatropha curcas* by *Bacillus* fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 115(2): 168-172.
- Puello-Cruz AC, Ordoñez-Rosas ML, García-Ortega A, Angulo-Escalante MA, Almazán-Rueda P, Domínguez-Jiménez VP. 2013. Biochemical composition and evaluation of *Jatropha curcas* meal as a replacement for fishmeal in diets of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 21: 273-282.
- Reyes-Fernández P, López-Martínez FJ, Mejía-Vázquez C, Mendoza-Díaz S, Reynoso-Camacho R, García-Gasca T. 2008. Contenido de compuestos fenólicos en extractos de harina de frijol cocido y evaluación de su efecto citotóxico en células de cáncer de mama. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- Rodríguez-Calle R, Suárez-Hernández J, Támara-Hernández Y. 2016. Caracterización de la torta obtenida del prensado del fruto de *Jatropha curcas*. *Pastos y Forrajes* 39: 72-75.
- Silva A, Cuzón G, Gaxiola G. 2013. Requerimientos de proteína y energía en juveniles silvestres del mero rojo *Epinephelus morio*. En: Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Villarreal-Cavazos DA, Gamboa-Delgado J, Alvarez-González C. (Eds). *Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola*, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. Pp. 521-531.
- Solomon SG, Okomoda VT, Torkor EF. 2016. Growth performance of *Clarias gariepinus* fingerlings fed *Jatropha curcas* kernel meal. *International Journal of Aquaculture* 6: 1-6.
- Veerabhadrapa MV, Shivakumar SB, Devappa S. 2014. Solid-state fermentation of *Jatropha* seed cake para optimization of lipase, protease, and detoxification of anti-nutrients in *Jatropha* seed cake using *Aspergillus versicolor* CJS-98. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 117(2): 208-214.
- Wang XH, Ou L, Fu LL, Zheng S, Lou JD, Gomes-Laranjo J, Li J, Zhang C. 2013. Detoxification of *Jatropha curcas* kernel cake by a novel *Streptomyces fomicarius* strain. *Journal of Hazardous Materials* 260: 238-246.
- Zhang X, Yang Z, Liang J, Tang L, Chen F. 2016. Detoxification of *Jatropha curcas* seed cake in solid fermentation of newly isolated endophytic strain and nutrition assessment for its potential utilizations. *International Biodeterioration and Biodegradation* 109: 202-210.



Diferencias morfo-fisiológicas en plántulas de malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) obtenidas en sistema de inmersión temporal

Ana Karen Méndez López, Sonia Ruiz González, Isidro Ovando Medina*

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

El consumo mundial de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) ha tenido auge debido a que es una fuente alimenticia nutritiva y de alta digestibilidad. Los sistemas de inmersión temporal (SIT), permiten la automatización de la etapa de multiplicación *in vitro* disminuyendo los costos de producción y permite que ambas, la morfología y el comportamiento fisiológico de los cultivos sean semejantes a los que presentan las plantas en condiciones *ex vitro*. Con la finalidad de determinar la influencia de las variables frecuencia y tiempo de inmersión sobre el crecimiento de *X. sagittifolium* en los sistemas de inmersión temporal (SIT), se diseñó un experimento factorial 2^3 , 2 frecuencias de inmersión (12 y 24 h), 2 tiempos de inmersión (15 y 20 min) y 2 volúmenes de medio de cultivo MS (25 y 50 mL). Se evaluaron variables morfológicas sobre el crecimiento de plántulas. A pesar de que se obtuvieron diferencias significativas en número de hoja, peso fresco (mg) a los 21 días, peso fresco (mg) de raíz, peso seco (mg) y número de raíz se considera que ambos volúmenes de medio de cultivo MS aquí evaluados (25 y 50 mL) son adecuados pues permiten reducir la frecuencia de inmersión y modificar el tiempo de inmersión.

Palabras clave:

Crecimiento vegetal
Frecuencia de inmersión
Organogénesis
Tiempo de contacto
Volumen de medio

Keywords:

Plant growth
Immersion frequency
Organogenesis
Contact time
Medium volume

Morpho-physiological differences in malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) seedlings obtained in a temporary immersion system

Abstract

The world consumption of malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) has boomed because it is a nutritious and highly digestible food source. The temporary immersion systems (TIS), allow the automation of the *in vitro* multiplication stage, reducing production costs and allowing both the morphology and physiological behavior of the cultures to be like those presented by plants in *ex vitro* conditions. In order to determine the influence of the variables frequency and immersion time on the growth of *X. sagittifolium* in temporary immersion systems (TIS), a 2^3 factorial experiment was designed, 2 immersion frequencies (12 and 24 h), 2 immersion times (15 and 20 min) and 2 volumes of MS culture medium (25 and 50 mL). Morphological variables on seedling growth were evaluated. Although significant differences were obtained in leaf number, fresh weight (mg) at 21 days, root fresh weight (mg), dry weight (mg) and root number, it is considered that both volumes of MS culture medium evaluated here (25 and 50 mL) are an adequate because they allow reducing the frequency of immersion and modifying the immersion time.

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,
Universidad Autónoma de
Chiapas.
Boulevard Príncipe Akishino
sin número, Colonia
Solidaridad 2000, CP.
30798.
Tapachula, Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9626427972.
Correo-electrónico:
isidro.ovando@unach.mx

1. Introducción

La malanga (*Xanthosoma sagittifolium*), es una planta perene tropical de cormo comestible que pertenece a la familia Araceae (Parra-Melchor et al., 2020). El consumo mundial (90% en fresco, Nazario-Lezama et al., 2020) ha cobrado gran importancia debido al contenido de almidón, de estructura microgranular, minerales (magnesio, hierro, fósforo, potasio, sodio, cobre y manganeso) y vitaminas (C, E y B6) que hacen de la malanga una fuente de alimento nutritiva y de alta digestibilidad (Madrigal-Ambriz et al., 2018). Por la presencia de almidón y su proporción de amilosa y amilopectina en sus cormos, puede ser utilizada en la industria manufacturera (papel, adhesivo y empaques biodegradables) y farmacéutica (Kaushal et al., 2015).

En México, la malanga se cultiva en Oaxaca, Veracruz y Puebla, que en conjunto conforman 100 hectáreas, de las cuales se cosechan 2,500 ton, destinadas a la exportación hacia Estados Unidos y Canadá (Mazariegos et al., 2016). Mazariegos et al. (2016), reportaron que, en la Región Soconusco de Chiapas, México se cultivan 6.1 hectáreas de este rizoma en los municipios de Tuxtla Chico (Ejido Sur de Guillén, 1era. Sección de Guillén Norte y 2da. Sección de Izapa) y Metapa de Domínguez (Cantón Victoria) para la comercialización en el mercado local.

La propagación de la malanga es asexual, a partir de la siembra de cormos o fragmentos de estos, lo cual tiene como ventaja el mantenimiento de la identidad y estabilidad genética de la descendencia. Sin embargo, este método de propagación tiene como desventaja la diseminación de plagas y enfermedades virales, fungosas y bacterianas, que pueden disminuir el rendimiento del cultivo (Vilchez et al., 2011).

Diversos clones de malanga son propagados usando la técnica del cultivo *in vitro* vía organogénesis directa, a través de yemas axilares. Este sistema de regeneración reporta los menores índices de variación genética y es el método más confiable para lograr un proceso de proliferación repetible y libre de agentes contaminantes. Sin embargo, la organogénesis directa está limitada como metodología eficiente de aplicabilidad comercial, principalmente por ciertas limitaciones en cuanto a su porcentaje de multiplicación, altos costos en insumos de producción, a causa del elevado número de operaciones manuales que requiere (Santos-Pino et al., 2011).

Los nuevos retos del cultivo de tejidos incluyen la disminución de costos, la automatización, además la tendencia de pasar de medios sólidos a medios líquidos (García-Ramírez et al., 2016). Dentro de los métodos de multiplicación en medio líquido se encuentran los sistemas de inmersión temporal (SIT), los cuales permiten la automatización de la etapa de multiplicación *in vitro*, ya que reduce costos por explantes, permite mayor optimización biológica por los altos coeficientes de multiplicación que se obtienen y mejor comportamiento de las vitroplantas *ex vitro* (Basail-Pérez et al., 2012).

Las principales desventajas del cultivo en SIT son la hiperhidratación y la oxidación de los tejidos (González et

al., 2011). Sin embargo, Ramírez-Mosqueda et al. (2016), demostraron la utilidad del SIT para micropropagación de *Vanilla planifolia*, con un mayor número de brotes y raíces por explantes. Las altas tasas de supervivencia de las plántulas obtenidas con el sistema de inmersión temporal aseguraron el éxito del proceso de micropropagación. Además, no se observaron diferencias en la calidad morfológica o el vigor de los brotes obtenidos a partir del sistema de inmersión temporal.

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar las diferencias en el desarrollo morfológico y fisiológico de plántulas obtenidas por sistema de inmersión temporal de malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) en el Soconusco, Chiapas, México.

2. Materiales y métodos

2.1. Material vegetal

Se utilizaron plántulas de *X. sagittifolium* cultivadas *in vitro* mediante organogénesis, proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biociencias (IBC) de la Universidad Autónoma de Chiapas (UNACH). Las vitroplantas fueron subcultivadas en frascos de vidrio de 250 mL con 25 mL de medio MS (Murashige y Skoog, 1962). Para llevar a cabo los experimentos en sistema de inmersión temporal se utilizaron plántulas con una hoja y sin raíces.

2.2. Sistema de inmersión temporal

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) se conformaron en dos secciones: la primera sección consistió en dos frascos de vidrio de 400 mL, uno contenía 100 mL medio de cultivo MS y el otro 4 vitroplantas; la segunda sección consistió en dos frascos de 400 mL, uno contenía 200 mL medio de cultivo MS y el segundo 4 vitroplantas.

Los filtros consistieron en frascos de vidrio empacados con algodón quirúrgico conectados a dos tubos de cobre de 6.35 mm de diámetro interno, el primero de 13 cm de altura se utilizó para conducir el aire a la parte inferior del frasco, el segundo de 5 cm se utilizó para la salida de aire. Los frascos de los SIT y los filtros se sellaron con tapones de goma No. 11 y No. 10, respectivamente.

La conexión de los frascos fue mediante mangueras Truper® de PVC de 4.7 mm de diámetro interno con conectores de cobre. El medio de cultivo MS fluyó de un frasco a otro mediante la presión que se ejerció con una bomba de aire (SAP-300 Sunny®) conectada al filtro de aire del frasco con medio de cultivo MS. Para regresar el medio de cultivo se invirtió el flujo de aire.

2.3. Frecuencia y tiempo de inmersión

Con la finalidad de determinar la influencia de la frecuencia y tiempo de inmersión sobre el crecimiento de *X. sagittifolium* en los SIT, se estableció un diseño factorial 2³. Se utilizó un tratamiento adicional con medio semisólido para fines comparativos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos de frecuencias y tiempos de inmersión de *Xanthosoma sagittifolium* en dos volúmenes de medio de cultivo.

Tratamientos	Frecuencia de inmersión (h)	Tiempo de inmersión (min)	Volumen de medio (mL/brote)
1	12	15	25
2	12	20	25
3	24	15	25
4	24	20	25
5	12	15	50
6	12	20	50
7	24	15	50
8	24	20	50
9	SEMI-SÓLIDO		

2.4. Evaluación de variables morfo-fisiológicas

Se evaluaron 11 variables morfo-fisiológicas durante 21 días sobre el crecimiento de plántulas de *X. sagittifolium*. Las variables consistieron en: número de hojas nuevas, número de brotes, número de brotes con síntomas de hiperhidricidad, número de raíces, contenido de clorofila, grosor de la lámina de hoja, número de estomas, tamaño de estomas, peso fresco (mg), peso fresco de raíz (mg), peso seco (mg), peso seco de raíz (mg) y porcentaje de humedad (%).

2.5. Análisis de datos

El experimento fue realizado por triplicado. Para evaluar las variables dependientes del SIT se aplicó ANOVA seguido de la prueba de medias de Tukey ($P < 0.05$) utilizando el paquete estadístico XLSTAT.

3. Resultados

3.1. Número de hojas

El tratamiento T8 mostró el mayor número de hojas, siendo 18.33 el valor promedio. Los que le siguen son los tratamientos T6, T9, T4 y T7, donde el rango osciló entre 13 y 14 hojas (Figura 1). El resto de los tratamientos se encontró por debajo de 13, siendo el tratamiento T3 el que menores hojas tuvo con un valor de 9. El análisis de varianza ($F = 2.488$, $P = 0.042$), indicó que hay diferencias significativas entre los tratamientos y la comparación de medias mostró que el T8 fue uno de los tratamientos que tuvo el mayor número de hojas a diferencia de los tratamientos T1, T2 y T3.

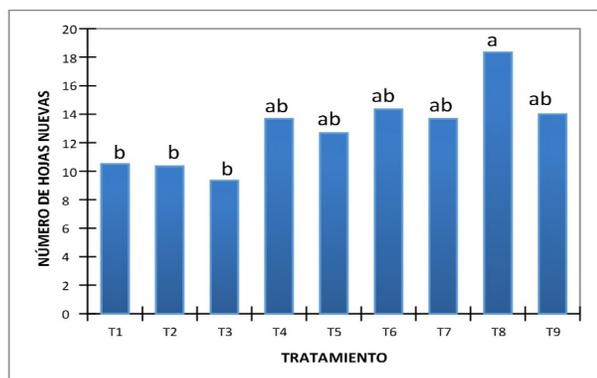


Figura 1. Número de hojas por tratamientos. Letras iguales no hay diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

3.2. Número de brotes

El valor de número de brotes por tratamiento osciló entre 9.0 a 17.0, observando que el tratamiento T6 fue el de mayor número de brotes ($n = 17.0$), seguido por el tratamiento T8. El tratamiento con menor valor de número de brotes fue T7 (Figura 2). El análisis de varianza indicó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, por lo que se concluye que el número de brotes entre todos los tratamientos es similar.

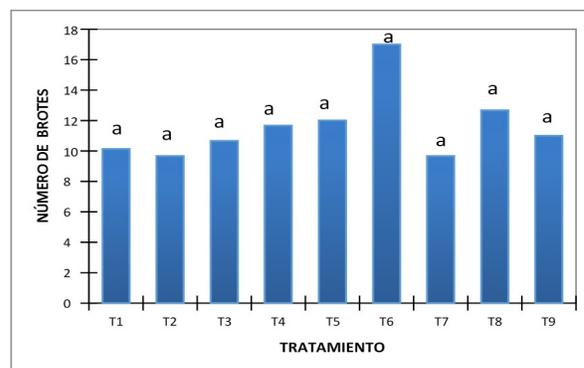


Figura 2. Número de brotes por tratamientos. Letras iguales no hay diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

3.3. Número de brotes con síntomas de hiperhidricidad

El valor de número de brotes con síntomas de hiperhidricidad por tratamiento osciló entre 4.0 a 10.0, observando que los tratamientos T1 y T9 presentaron los mayores valores de número de brotes con hiperhidricidad, 10.1 y 8.6, respectivamente. El tratamiento con menor valor de número de brotes con síntomas de hiperhidricidad fue T7 (Figura 3). A pesar de esto, el análisis de varianza indicó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, observando que existió similitud en los números de brotes con síntomas de hiperhidricidad entre todos los tratamientos.

3.4. Variable raíz

El tratamiento T8 fue el único que superó el número promedio (64.33) de raíces. Los que le siguen son los tratamientos T6 y T3, donde el rango osciló entre 42 y 44 raíces (Figura 4). El resto de los tratamientos se encontró por

debajo de 40 y superiores a 17 raíces, siendo en este último valor el correspondiente para el tratamiento T1. El análisis de varianza reveló que hay diferencias significativas entre los tratamientos, observando con ello que el T8 fue el tratamiento que más raíces tuvo.

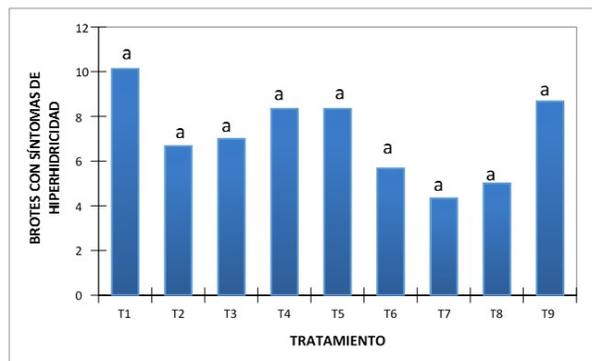


Figura 3. Número de brotes con síntomas de hiperhidricidad por tratamientos. Letras iguales no hay diferencias estadísticas (P<0.05).

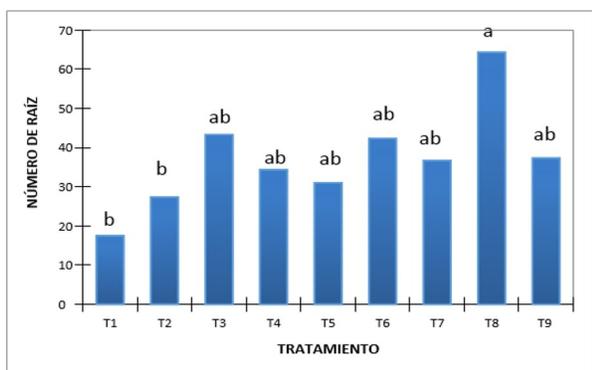


Figura 4. Número de raíces por tratamientos. Letras iguales no hay diferencias estadísticas (P<0.05).

3.5. Contenido de clorofila

A pesar de que las plántulas de los tratamientos T7 y T8 fueron las que contenían más clorofila (27.00 SPAD), se observó que los tratamientos T6 y T9 fueron los que estuvieron próximos a los tratamientos más sobresalientes (Figura 5), sin embargo, el análisis de varianza reveló que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, que existió similitud en los valores SPAD de clorofila entre todos los tratamientos.

3.6. Grosor de lámina

Los tratamientos más sobresalientes en esta variable fueron el T1 y T6 (Figura 6). Las plántulas de los demás tratamientos se encuentran en un rango de 0.07 a 0.11 mm en grosor de lámina foliar. El análisis de varianza aplicado reveló que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, observando que existió similitud en los valores de grosor de lámina foliar entre todos los tratamientos.

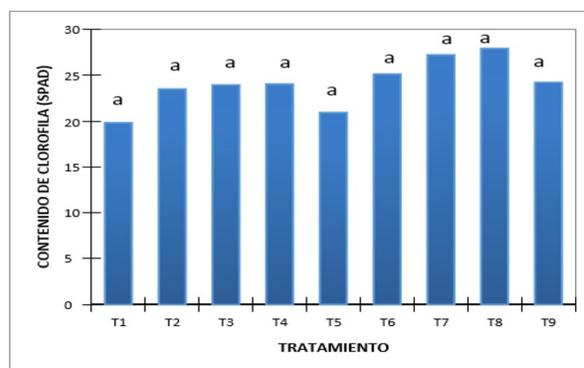


Figura 5. Concentración de clorofila en valor SPAD en todos los tratamientos. Letras iguales no hay diferencias estadísticas (P<0.05).

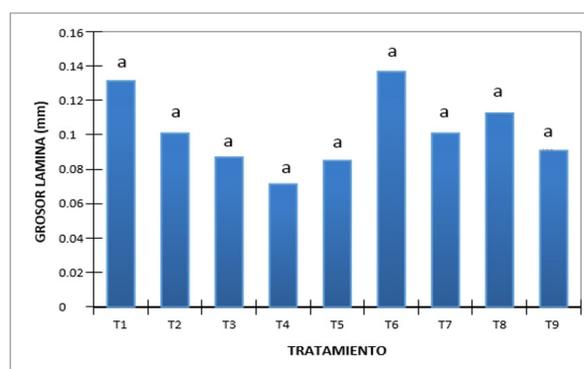


Figura 6. Grosor de lámina foliar en todos los tratamientos. Letras iguales no hay diferencias estadísticas (P<0.05).

3.7. Variable peso

El tratamiento T6 fue el único que superó el valor promedio (3026 mg) de la variable peso. Los que le siguen es el tratamiento T8, siendo el valor 2356 mg (Figura 7). El resto de los tratamientos se encontró por debajo de 1984 mg y superiores a 1230 mg, siendo este último valor el correspondiente al tratamiento T2. El análisis de varianza indicó que hay diferencias significativas entre los tratamientos, observando con ello que el T6 fue diferente de los tratamientos T1 y T2.

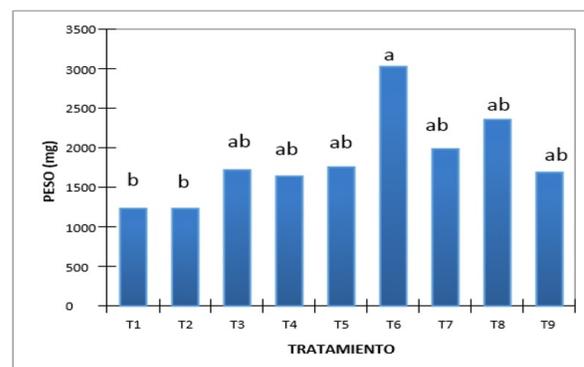


Figura 7. Valor de peso en todos los tratamientos. Letras iguales no hay diferencias estadísticas (P<0.05).

3.8. Variable humedad

El tratamiento más sobresaliente fue T5 (Figura 8). Los demás tratamientos se encuentran en un rango de 92 y 94% de humedad. A pesar de lo anterior, el análisis de varianza aplicado indicó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, observando que existió similitud en los valores de porcentaje de humedad entre todos los tratamientos.

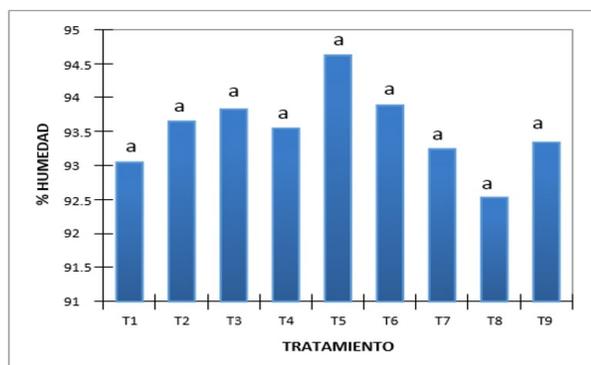


Figura 8. Valor de porcentaje de humedad en todos los tratamientos. Letras iguales no hay diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

3.9. Estomas en el haz de la hoja

Los primeros tres tratamientos superaron 40 estomas por hoja, siendo el tercero el que presentó el mayor número ($n=58$) (Figura 9). El resto de los tratamientos se encontró entre 30 y 39 estomas por hoja. El T4 fue el que menor número de estomas presentó. El análisis de varianza indicó que hay diferencias significativas entre los tratamientos, observando con ello que el T3 y T2 son diferentes al T4. El único tratamiento diferente al testigo (T9) fue el T3.

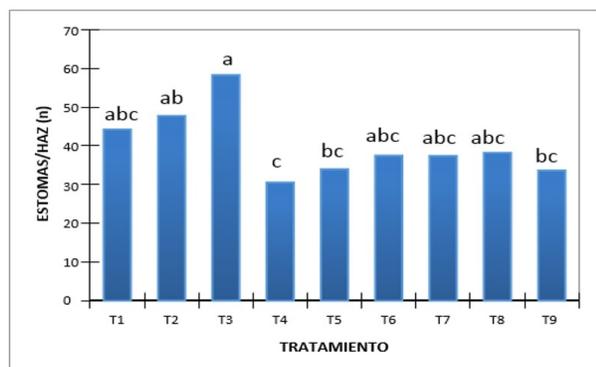


Figura 9. Número de estomas en el haz de la hoja por tratamientos. Letras iguales no hay diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

3.10. Estomas en el envés de la hoja

Los primeros tres tratamientos superaron 50 estomas por hoja, siendo el T2 el que presentó el mayor número ($n=58$) (Figura 10). El resto de los tratamientos se encontró entre 33 y 49 estomas por hoja, siendo T7, T8, T4 y T6, los que

presentaron valores menores a 40 estomas por hoja. El T4 y T6 fueron los de menor número de estomas. El análisis de varianza indicó que hay diferencias significativas entre los tratamientos, observando con ello que T1 y T2 son diferentes al T4 y T6, observando una diferencia numérica promedio de 20 entre estos. Todos los tratamientos establecidos tuvieron similitud en el número de estomas con el tratamiento testigo.

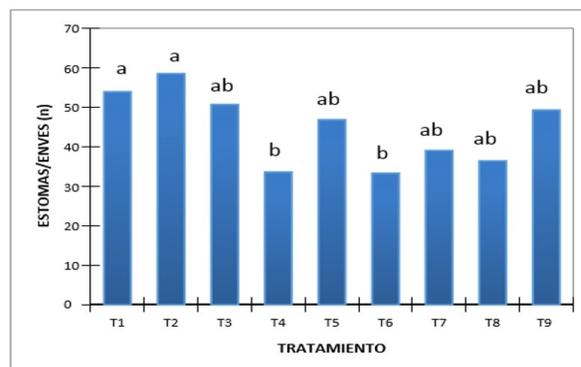


Figura 10. Número de estomas en el envés de la hoja por tratamientos. Letras iguales no hay diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

3.11. Longitud del estoma en el haz de la hoja

En todos los tratamientos, la longitud de los estomas que se observó fue muy similar, oscilando el tamaño de forma general entre 23 y 26 μm . El tratamiento T3 en promedio presentó el mayor largo de estoma y el T2 fue el que menor longitud presentó (Figura 11). El análisis de varianza indicó que no hay diferencias significativas entre los tratamientos.

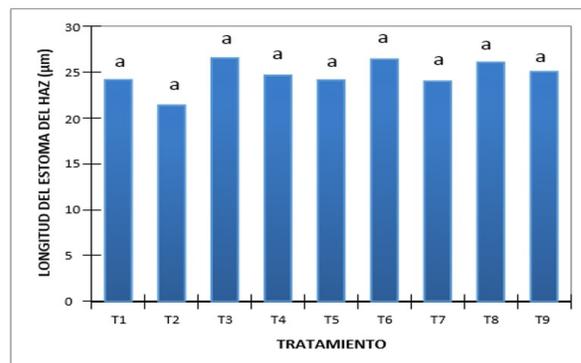


Figura 11. Longitud de la estoma en el haz de la hoja por tratamientos. Letras iguales no hay diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

3.12. Ancho del estoma del haz de la hoja

El T9 y el T3, fueron los que tuvieron los valores mayores de ancho del estoma, y el T2 fue donde se observó el menor valor de ancho del estoma. En el resto de los tratamientos el valor osciló de 18.20 a 19.20 μm , observando que hay una fuerte similitud en anchura de estoma entre estos tratamientos (Figura 12). El análisis de varianza indicó que existen

diferencias significativas entre los tratamientos, observando que únicamente el T2 fue diferente a T9.

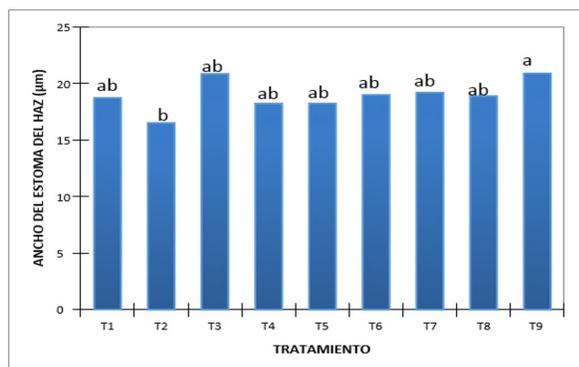


Figura 12. Ancho del estoma en el haz de la hoja por tratamientos. Letras iguales no hay diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

3.13. Longitud del estoma en el envés de la hoja

El valor de longitud del estoma por hoja en todos los tratamientos osciló entre 23 y 28 µm, observando que el tratamiento T3 fue el de mayor longitud ($l=28$) y el T2 tuvo el menor valor de longitud (Figura 13). El análisis de varianza indicó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.

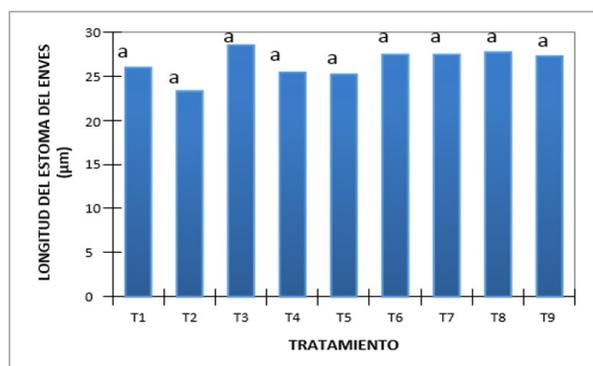


Figura 13. Valor de longitud de la estoma en el envés de la hoja por tratamientos. Letras iguales no hay diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

3.14. Ancho del estoma del envés de la hoja

El valor de ancho del estoma por hoja en todos los tratamientos osciló entre 17 y 20 µm, observando que el tratamiento T9 fue el de mayor ancho y el T2 tuvo el menor valor de longitud (Figura 14). El análisis de varianza indicó que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, observando que existió similitud en los valores de ancho en estomas entre todos los tratamientos.

4. Discusión

El mejor tiempo de inmersión fue de 15 min para las variables número de hoja, peso fresco de la raíz, peso seco de la raíz y número de raíz. Prolongados periodos de inmersión ocasionan incremento en la hiperhidricidad (Basail-Pérez et

al. 2013). Martre et al. (2001) encontraron que al incrementar el tiempo de inmersión de 12 a 22 min los brotes presentaron hiperhidricidad, longitud inferior y menor número de hojas. Con tiempos de inmersión de 15 y 20 min se hubiera esperado obtener presencia de hiperhidricidad pero no se encontraron datos significativos para esa variable.

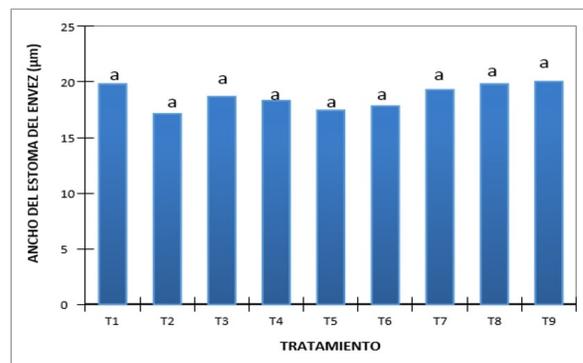


Figura 14. Valor de ancho del estoma en el envés de la hoja por tratamientos. Letras iguales no hay diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

En relación con el número de hojas, el mayor número se presentó en la frecuencia de inmersión de 24 h y la más baja fue en 12 h, coincidiendo esta última con Arano-Avalos et al. (2019), donde la presencia de hojas fue menor en ese mismo tiempo, pero el mayor número de hojas lo obtuvieron en la frecuencia de inmersión de 4 h.

Arano-Avalos et al. (2019) determinaron que los mejores volúmenes de medio de cultivo MS por plántula, para obtener el mayor número de brotes fueron de 25 y 50 mL; aunque no se obtuvo los resultados esperados en la variable número de brote, debido a que no se obtuvieron diferencias significativas a pesar de que se utilizaron los volúmenes de 20 y 25 mL en las pruebas; esto se puede deber a que las frecuencias de inmersión y el tiempo de inmersión tuvieron influencia negativa en el volumen de medio MS, porque el desarrollo de los brotes está relacionado a la renovación de aire y al contacto del medio de cultivo con las plántulas (Arano-Avalos et al., 2019).

También la frecuencia y el tiempo de inmersión pudieron influir en el contenido de clorofila porque no se obtuvo diferencias significativas en esa determinación, siendo los volúmenes de 12.5 y 25 mL los más bajos en la producción de clorofila reportados por Arano-Avalos et al. (2019), por lo tanto se esperaba obtener datos significativos en el volumen de 50 mL, debido a que en un mayor volumen de medio de cultivo hay más disponibilidad de nutrientes, por lo tanto una mayor producción de clorofila.

El SIT le permite a las plántulas tener mejor asimilación de los nutrientes del medio de cultivo líquido en comparación con el medio de cultivo semisólido, al estar las plántulas en contacto con el medio cultivo líquido de manera constante, estas al retener una capa de medio de cultivo incrementa la disponibilidad y la asimilación de los nutrientes, pero

también influye la frecuencia y el tiempo de inmersión (Castro et al., 2001; Escalona et al., 1999; Pinto de Lemos et al., 2001), por lo tanto, se piensa que el método probado con los volúmenes de medio de cultivo MS de 25 y 50 mL son una buena opción reduciendo la frecuencia y modificando el tiempo de inmersión; como reportan Basail-Pérez et al. (2013), quienes obtuvieron los mejores resultados con un tiempo de inmersión de 10 min y una frecuencia de inmersión de 3 h.

En lo relativo al número de estomas por tratamiento, específicamente en el envés, el mayor número se obtuvo a una frecuencia de inmersión (F. I.), tiempo de inmersión (T. I.) y volumen de medio (V. M.), 12.0, 15.0 y 25.0, respectivamente, a diferencia de los valores de F. I., T. I. y V. M. de 24.0, 15.0 o 20.0 y 50.0 respectivamente, donde se obtuvieron tanto en el haz como en el envés cantidades considerables de estomas. Estos resultados podrían revelar un efecto del estrés que tuvieron los brotes vegetales durante el proceso de inmersión en los sistemas, lo que provocó que produjeran más estomas en la zona de menor recepción lumínica. Lo anterior concuerda con lo expuesto por Molina-El Hage et al. (2008), quienes indicaron que las plántulas en condiciones *in vitro*, la energía implicada en las funciones del desarrollo de las hojas y en la función de las hojas mismas, la obtienen del medio del cultivo para producir sus propios asimilados, induciendo con ello el arreglo morfométrico más viable acorde al proceso de adaptación posterior, que es una respuesta que los autores lo atribuyen a estrés.

Al comparar la longitud de los estomas, se encontró que entre tratamientos y entre cara de la hoja los tamaños fueron similares. Lo anterior se interpreta que independientemente de los valores de F.I., T. I. y V.M., los brotes expuestos a estas condiciones no afectaron al proceso de generación de longitud de las estomas. Toral et al. (2010), indican que el cambio en las condiciones ambientales induce a cambios en el tamaño de los estomas, que es una característica de adaptabilidad de los tejidos según la especie. Lo anterior no coincide con lo encontrado en el presente trabajo para la característica longitud, pero, por otro lado, en lo correspondiente a la anchura, si hay coincidencia, ya que en el valor de ancho de estoma las condiciones más viables encontradas en el presente estudio de F. I., T. I. y V. M. fueron de 12.0, 15.0 o 20.0 y 25.0, mostrando tamaños que oscilaron entre 17.0 y 20.0 μm , independientemente de si es en el haz o en el envés. Álvarez-Bello et al. (2015) indicaron que los cambios de longitud y anchura de los estomas presentes en las áreas foliares de las plantas, son inducidas por moléculas oligogalacturónicas, donde dependiendo del tipo de estrés, el efecto del cambio en tamaño de anchura es mayor, independientemente de la zona haz o envés.

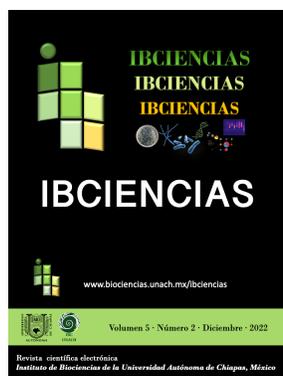
Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias

- Álvarez-Bello I, Reynaldo-Escobar IM. 2015. Efecto del Pectimorf® en el índice estomático de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Cultivos Tropicales 36(3): 82-87.
- Arano-Avalos S, Gómez-Merino FC, Mancilla-Álvarez E, Sánchez-Páez R, Bello- Bello JJ. 2019. An efficient protocol for commercial micropropagation of malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott) using temporary immersion. Scientia Horticulturae 261: 108998.
- Basail-Pérez M, Medero-Vega V, Ventura-Martín J de La C, Otero-Gálvez E, Torres-Delgado M, López-Torres J, Cabrera-Jova M, Santos-Pino A, Rayas-Cabrera A, Bauta-Toledo M, Beovidez-García Y. 2012. Multiplicación del clon de banano 'FHIA-18' (AAAB) en Sistema de Inmersión Temporal. Revista Colombiana de Biotecnología 14 (1): 8-19.
- Basail-Pérez M, Medero-Vega V, Torres-Delgado M, López-Torres J, Santos-Pino A, Rayas-Cabrera A, Bauta-Toledo M, Beovidez-García Y, Ortega-Ortiz A. 2013. Nueva alternativa para la micropropagación en inmersión temporal del cultivar de plátano vianda "INIVITPV-2011"(AAB). Revista Colombiana de Biotecnología 15 (1): 98-107.
- Castro D, Díaz J, Montoya N. 2001. Clonal propagation of bananas by biorreactors of temporary immersion. En: Acrobat. Memorias XV Reunión: Realizada en Cartagena de Indias, Colombia.
- Escalona M, Cid M, Lezcano Y, Capote I, Yáñez E, González J. 1999. Propagación de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en biorreactores de inmersión temporal. Efecto de la frecuencia de inmersión y el paclobutrazol. BioVeg'99. Ciego de Ávila, Cuba. Libro de resúmenes.
- García-Ramírez Y, González-González M, Torres-García S, Freire-Seijo M, Pérez M, Mollineda-Trujillo A, Rivero L, Barbon R. 2016. Efecto de la densidad de inóculo sobre la morfología y fisiología de los brotes de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl cultivados en Sistema de Inmersión Temporal. Biotecnología Vegetal (16): 231-237.
- González R, Rios D, Avilés F y Sánchez-Olate M. 2011. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus globulus* mediante sistema de inmersión temporal. Bosque (32): 147-154.
- Kaushal P, Kumar V, Sharma HK. 2015. Utilization of taro (*Colocasia esculenta*): A review. Journal of Food Science and Technology 52(1): 27-40.
- Madrigal-Ambriz LV, Hernández-Madrigal JV, Carranco-Jáuregui MN, Calvo- Carrillo MC, Casas-Rosado RG. 2018. Caracterización física y nutricional del tubérculo Malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott) de Actopan, Veracruz, México. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 68(2): 175-183.
- Martre P, Lacan D, Just D, Teison C. 2001. Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. Plant Cell Tissue and Organ Culture 67: 25-35.
- Mazariegos-Sánchez A, Águila-González JM, Milla-Sánchez AI, Espinoza-Zaragoza S, Martínez-Chávez J, López-Sánchez C. 2016. Cultivo de malanga (*Colocasia esculenta* Schott) en Tuxtla Chico, Chiapas, México. Agroproductividad 10: 75-80.
- Molina-El Hage LA, Gonzales-Olmedo JL, Fundora Z, Abdunour J, Desjardins Y, Escalona M. 2008. Aclimatización *in vitro* y *ex vitro*: una estrategia para mejorar la

- productividad de la micropropagación en plantas. *Revista Revive* 15: 15.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.
- Nazario-Lezama N, Arvizu-Barrón E, Mayett-Moreno Y, Álvarez-Ávila M del C, García-Pérez E. 2020. Producción y comercialización de malanga (*Colocasia esculenta* (L.) Shott) en Actopan, Veracruz, México: Perspectiva de cadena de valor. *Agroproductividad* 13(5): 59-64.
- Parra-Melchor ME, Pérez-Vázquez A, Arvizu-Barrón E. 2020. Evolution of the Agri-Food chain concept in the 21st Century: the taro case. *Agroproductividad* 13(11): 81-86.
- Pinto de Lemos EE, De Souza-Ferreira M, Calheiros-Alencar LM, Lessa-Oliveira JG, Sarmento-Magalhães V. 2001. Micropropagation of banana terra using temporary immersion bioreactors. *Revista Brasileira de Fruticultura* 23(3): 482-487.
- Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG. 2016. Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 52(2): 154-160.
- Santos-Pino A, Cabrera-Jova M, Gómez-Kosky R, López-Torres J, Rayas-Cabrera A, Basail-Perez M, Medero-Vega V, Beovidez-García Y. 2011. Multiplicación en sistema de inmersión temporal del clon de malanga “Viequera” (*Xanthosoma* spp.). *Revista Colombiana de Biotecnología* (13): 97-106.
- Toral M, Manríquez A, Navarro-Cerrillo R, Tersí D, Naulin, P. 2010. Características de los estomas, densidad e índice estomático en secuoya (*Sequoia sempervirens*) y su variación en diferentes plantaciones de Chile. *Bosque* 31(2): 157-164.
- Vilchez J, Albany N, Martínez L, Molina M, Pirela C, Molina M, Álvarez C, Chirinos J. 2011. Multiplicación en sistemas de inmersión temporal y enraizamiento *ex vitro* de ocumo blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). *Revista Colombiana de Biotecnología* 13(1): 94-102.



Evaluación en campo de *Serratia marcescens* IBC-CR18 como agente de biocontrol de la roya del café

Benjamín Moreno-Castillo, Abdías Espada-Sánchez, Miguel Salvador-Figueroa, María de Lourdes Adriano-Anaya*

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar en campo el efecto de la aspersión de la cepa *Serratia marcescens* IBC-CR18 como potencial agente de biocontrol de la roya del café (*Hemileia vastratrix*) en plantas de café árabe variedad “Marago” de siete meses de edad. Se evaluó el cultivo crudo (10^9 UFC mL⁻¹ más metabolitos) obtenido en caldo nutritivo por 72 h bajo fermentación estática a 26 °C (± 2 °C) y el cultivo crudo sometido a congelación por 48 h previamente a la aspersión en campo, con la finalidad de inactivar las células bacterianas. Se incluyó un tratamiento químico convencional (oxicloruro de cobre al 85% como ingrediente activo, a dosis de 5 g L⁻¹ de agua), un biofungicida comercial a base de *Bacillus subtilis* (Serenade® Opti, 5 g L⁻¹) y un Control (agua). El análisis de medidas repetidas del índice de infección mostró diferencias altamente significativas entre tratamientos ($F_{4,437}=4.47$; $P=0.0015$), las cuales se presentaron al final del ensayo. Después de la aspersión de los tratamientos sobre las plantas de café, el biofungicida comercial fue el que presentó el menor valor de área bajo la curva del progreso de la enfermedad (abcpe) con respecto a los demás tratamientos y al Control ($F_{4,115}=3.00$; $P=0.02$) y causó retraso en la epidemia por 20.3 días en comparación con el testigo. Los tratamientos a base del cultivo crudo de la bacteria y cultivo crudo congelado retrasaron el progreso de la enfermedad por 12.2 y 15.3 días, respectivamente, con respecto al Testigo.

Palabras clave:

Cultivo crudo
Epidemia
Escala
Marago
Severidad

Keywords:

Crude culture
Epidemic
Scale
Marago
Severity

Field evaluation of *Serratia marcescens* IBC-CR18 as biocontrol agent of the Coffee leaf rust

Abstract

The aim of this work was to assess in the field the effect of *Serratia marcescens* strain IBC-CR18 as potential biocontrol agent of the coffee leaf rust (*Hemileia vastratrix*), sprayed onto seven months-old Arabica coffee plants cv. “Marago”. We evaluated the crude culture of the strain (10^9 UFC mL⁻¹ and metabolites) grown on nutrient broth during 72 h under static fermentation at 26 °C (± 2 °C) and the crude culture subjected to freeze-thaw 48 h before field spraying, with the objective to inactivate the bacterial cells. A conventional chemical treatment (85% copper oxychloride as active ingredient, at a dose of 5 g L⁻¹ of water), a commercial biofungicide based on *Bacillus subtilis* (Serenade® Opti, 5 g L⁻¹) and a Control (water) were included. The repeated measures analysis of the infection indices revealed statistical differences between treatments ($F_{4,437}=4.47$; $P=0.0015$), which were noticeable at the end of the field trial. After spraying of the treatments on coffee plants, the commercial biofungicide accumulated the lowest amount of disease (area under disease progress curve) in comparison to the rest of the treatments and control ($F_{4,115}=3.00$; $P=0.02$), and caused a delay of the epidemics for 20.3 days as compared to Control. On the other hand, bacterial crude culture and freeze-thaw crude culture, delayed the disease progression for 12.2 y 15.3 days, respectively, in comparison to Control.

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,
Universidad Autónoma de
Chiapas.
Boulevard Príncipe Akishino
sin número, Colonia
Solidaridad 2000, CP.
30798.
Tapachula, Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9626427972.
Correo-electrónico:
maria.adriano@unach.mx

1. Introducción

A nivel mundial, México se ubica dentro de los primeros diez países productores de café (Canet Brenes et al., 2016). Durante el año 2021, se produjeron 947 000 ton de café cereza en una superficie de alrededor de 710 000 ha, donde Chiapas contribuyó con el 36% de la producción total (SIAP, 2021). En México, la mayoría de la producción de café se obtiene de las variedades arábicas (*Coffea arabica* L.), las cuales ofrecen alta calidad de taza pero que en campo son altamente susceptibles al hongo *Hemileia vastatrix*, agente causal de la roya del café (Hernández et al., 2021). Este hongo es considerado el patógeno más destructivo y de mayor importancia económica para el sector cafetalero a nivel mundial, el cual puede provocar pérdidas en rendimiento superiores al 35% y tener impacto epidemiológico poliético en los años posteriores a su aparición en las plantaciones (Talhinhas et al., 2017).

La roya del café fue detectada por primera vez en México en 1981, específicamente en el Soconusco, Chiapas (Barrera-Gaytán y Gómez-Ruiz, 2019), pero durante los subsecuentes 30 años no se observaron niveles de infección económicamente importantes en los cafetales sembrados con las variedades susceptibles de café arábigo que se cultivaban tradicionalmente por esos años (árabe, bourbon, marago, catuai). Sin embargo, durante el 2012 se presentaron niveles atípicos de la enfermedad en los cafetales de las regiones Soconusco y Sierra de Chiapas que oscilaron alrededor del 74% de incidencia y 30% de severidad, lo que causó una defoliación promedio de 36% en los cafetos (Barrera et al., 2013; Libert-Amico y Paz-Pellat, 2018) y pérdidas del 20% en rendimiento que fueron incrementándose en los años posteriores. Los especialistas han coincidido que los cambiantes patrones climáticos generados por el calentamiento global han impactado la dinámica de las epidemias de roya del café (Barrera et al., 2013; Canet Brenes et al., 2016; Henderson, 2019; Libert-Amico y Paz-Pellat, 2018). Aunque las variedades arábicas de café “Typica” y “Bourbon” son las preferidas por los productores, éstas se han sustituido por la especie tolerante “Robusta” (*C. canephora* Pierre ex Froehner) o por variedades e híbridos de *C. arabica* resistentes a la roya (Libert-Amico y Paz-Pellat, 2018, Hernández et al., 2021). Sin embargo, se han encontrado muchas variantes de *H. vastatrix* que han llegado a superar esta resistencia (Talhinhas et al., 2017).

El desarrollo de la enfermedad inicia cuando las uredinosporas germinan, lo cual ocurre entre las 12 y 24 h posteriores a su llegada a las hojas y requiere de una película de agua sobre la superficie foliar. Al cabo de 48 h se generan los apresorios sobre los estomas e ingresa el micelio al interior de la hoja. Los síntomas aparecen 14 días después de la germinación y la esporulación ocurre entre los 2 o 4 días posteriores a la aparición de los síntomas. Las temperaturas de 22 a 26 °C favorecen los procesos del hongo (Barrera-Gaytán et al., 2014; Toniutti et al., 2017). La roya causa daños en las las hojas, las ramas y en casos de alta severidad también en los frutos del café, además de provocar la

defoliación total o parcial de los cafetos. Inicialmente la enfermedad se manifiesta como puntos cloróticos que con el tiempo se vuelven manchas necróticas, sobre las cuales se forman esporulaciones polvosas de tonalidad amarillo-naranja y que finalmente conducen a la muerte del tejido infectado (Barrera-Gaytán et al., 2014; Toniutti et al., 2017). El manejo de la enfermedad se realiza principalmente mediante la aplicación de fungicidas sintéticos como el oxiclورو de cobre (de contacto) y triazoles (curativos, sistémicos) que previenen y eliminan el establecimiento del inóculo del patógeno sobre la superficie de las hojas y tallos (Talhinhas et al., 2017). Sin embargo, el oxiclورو de cobre es el preferido por tratarse de un fungicida relativamente barato, aunque su efectividad es limitada y se requieren aplicaciones continuas para lograr resultados favorables de control. Desafortunadamente, el uso continuo de este fungicida puede llegar a causar problemas de contaminación ambiental (Hernández et al., 2021). Esta situación ha propiciado la búsqueda de estrategias alternativas de biocontrol mediante el uso de microorganismos, los cuales son de bajo riesgo para el ser humano y de bajo impacto ambiental (Pandit et al., 2022; Retinassababady y Jeyalakshmi, 2014).

Los microorganismos ejercen varios modos de acción contra los hongos fitopatógenos: inducción de resistencia vegetal, competencia por espacio y nutrientes, hiperparasitismo y antibiosis (mediante la producción de enzimas micolíticas y metabolitos secundarios) (Köhl et al., 2019). Uno de los microorganismos ampliamente estudiados como agentes de biocontrol de fitopatógenos ha sido la bacteria *Serratia marcescens* (Enterobacteriaceae), la cual se caracteriza por tener un variado metabolismo secundario que la hace ser un potencial candidato agente de biocontrol de *H. vastatrix* (Soenens e Imperial, 2020). Por esta razón, el objetivo del presente estudio fue evaluar en campo los metabolitos extracelulares y las células bacterianas de *S. marcescens* cepa IBC-CR18, como agente de biocontrol de la roya del café en una plantación comercial del Soconusco, Chiapas, México.

2. Materiales y métodos

2.1. Microorganismo

La bacteria *Serratia marcescens* IBC-CR18 (antes FCA-CR18, en lo sucesivo referida como IBC-CR18) fue proporcionada por el cepario del Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas. La bacteria fue aislada de rizósfera de plantas de café variedad Bourbon en la localidad Plan Esperanza de la zona media-alta del municipio de Tapachula, Chiapas, México (Camposeco, 2017).

2.2. Preparación del inóculo de *S. marcescens* IBC-CR18

Después de la reactivación de la cepa en agar nutritivo, la bacteria fue cultivada en caldo nutritivo (pH 7) por 72 h bajo fermentación estática a temperatura ambiente (26±2 °C).

2.3. Tratamientos

Se evaluaron dos tratamientos de *S. marcescens*: 1) cultivo crudo (metabolitos y 10^9 UFC mL⁻¹) y 2) cultivo crudo sometido a congelación (-8 °C por 48 h), para inactivar las células bacterianas y evaluar en campo únicamente el efecto de los metabolitos extracelulares. Los tratamientos se realizaron durante el año 2021 en una plantación comercial de café árabe variedad Marago, ubicada en el Cantón el Triunfo municipio de Tapachula, Chiapas, México, en el rancho los Olivos (14°58'34.6", N 92°13'24.8", 440 msnm). El promedio de precipitación oscila alrededor de los 2000 mm y presenta un clima cálido-húmedo con abundantes lluvias en verano (INEGI, 2017). Las plantas experimentales fueron de siete meses de edad. Durante el experimento no se registraron aplicaciones de herbicidas, insecticidas o fungicidas, con excepción de los tratamientos evaluados en el presente ensayo, el cual se llevó a cabo del 20 de junio al 22 de octubre del 2021. Aparte de los dos tratamientos a base del inóculo bacteriano IBC-CR18, se incluyeron como tratamientos el oxiclورو de cobre con un contenido de 85% de ingrediente activo (dosis 5 g L⁻¹ de agua), un biofungicida comercial a base de *Bacillus subtilis* cepa QST713 con 1.3×10^{10} UFC g⁻¹ de producto formulado (Serenade® Opti, Bayer CropScience, dosis 5 g L⁻¹ de agua) y agua como control (testigo). Para la aplicación se utilizaron aspersores manuales de 1 L de capacidad (Klintek modelo ATO-100), calibrados a un gasto de 200 L ha⁻¹. Se aplicaron soluciones correspondientes a cada tratamiento de manera uniforme sobre el haz y envés de las hojas. Los tratamientos se establecieron bajo un diseño completamente al azar de cinco tratamientos y tres repeticiones, cada repetición consistió de ocho plantas experimentales. Las aspersiones de los tratamientos se realizaron cada 14 días y los muestreos de la enfermedad cada 30 días.

2.4. Índice de infección de las plantas

El índice de infección fue determinado mediante una escala de daño, establecida de acuerdo al porcentaje de la hoja con síntomas visibles de la roya: grado 0= sin síntomas de roya, grado 1= con puntos cloróticos, grado 2: 2-6% con síntomas, grado 3= 7-19% con síntomas, grado 4= 20-44% con síntomas, grado 5= 45-70% de la hoja con síntomas de roya, y grado 6= > 70% de la hoja con roya (Camposeco, 2017). Se analizaron todas las hojas de las plantas y en base a esta escala se calculó el índice de infección (II) para cada planta de acuerdo a la fórmula, $II (\%) = (\sum an/6N) \times 100$ (Carlier et al., 2002); donde: a es cada uno de los grados de la escala (0-6), n corresponde al número de hojas presentes en cada grado y N es el número total de hojas muestreadas. Con esta información, se calculó por cada planta el parámetro área bajo la curva del progreso de la enfermedad (abcpe), utilizando la fórmula $abcpe = \sum [(II_1 + II_2)/2] [t_2 - t_1]$ (Achicanoy, 2000; Mohapatra et al., 2008); donde: II₁ y II₂ son los índices de infección acumulados en los tiempos t₁ y t₂, respectivamente, siendo t₁ y t₂ los días transcurridos entre dos muestreos consecutivos.

La tasa de infección aparente (r) de cada tratamiento se calculó mediante la fórmula de Van der Plank (1964); $r = [1/(t_2-t_1)] [\ln(X_2/1-X_2) - \ln(X_1/1-X_1)]$; donde: t₁ y t₂ representan los días transcurridos (fecha inicial y fecha final del ensayo), X₁ y X₂ son la proporción acumulada de la enfermedad en t₁ y t₂. Con esta información, se calculó el factor Δt entre cada tratamiento y control (Whitney, 1976) usando la fórmula $\Delta t = (1/r) \ln(x_0/x_{os})$; donde: Δt es el retraso en el progreso de la enfermedad (en días) causado por el tratamiento (x_{os}) en comparación con el control (x₀), r es la tasa aparente de infección de x_{os} calculado con la fórmula de Van der Plank (1964).

2.5. Análisis de datos

El análisis de los índices de Infección (II) sobre el tiempo se realizó mediante un análisis de varianza de medidas repetidas ($\alpha=0.05$) y la separación de medias de los tratamientos en cada fecha de muestreo mediante los intervalos de confianza al 95%. Para el abcpe se realizó un análisis de varianza de un factor y la separación de medias mediante la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Previamente los valores de abcpe se transformaron mediante la raíz cuadrada para cumplir los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Los análisis estadísticos se realizaron en el paquete estadístico R (R Core Team, 2021; ver 4.1.1., <https://www.R-project.org>) con apoyo de R Commander (versión 2.7-1). El valor del factor Δt se presenta como una medida descriptiva general del retraso en el progreso de la enfermedad causado por cada tratamiento.

3. Resultados y Discusión

El análisis de medidas repetidas reveló diferencias altamente significativas entre tratamientos al término de la evaluación en campo ($F_{4,437}=4.47$; $P=0.0015$). Inicialmente los tratamientos mostraron índices de infección desiguales, los cuales se homogenizaron hacia el segundo y tercer muestreo, para finalmente mostrar diferencias significativas en el cuarto muestreo entre las plantas tratadas y las del Control (Figura 1).

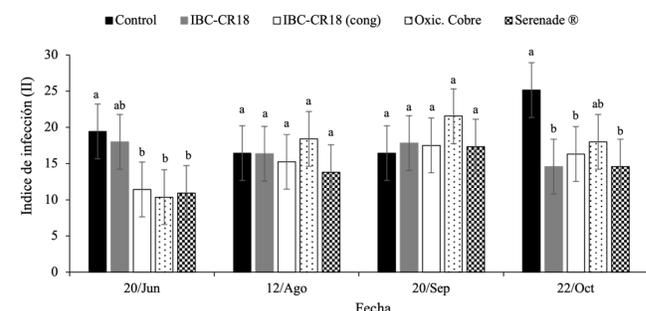


Figura 1. Evolución de los índices de infección (II) durante la evaluación en campo de IBC-CR-18 como agente de biocontrol de la roya del café. Las barras de error son los intervalos de confianza superior e inferior al 95%. Dentro de cada fecha de muestreo, barras con la misma letra son estadísticamente iguales ($P>0.05$).

Por otro lado, el análisis de varianza mostró diferencias estadísticas significativas entre tratamientos en cuanto al área bajo la curva del progreso de la enfermedad (abcpe) ($F_{4,115}=3.01$; $p=0.02$) siendo el biofungicida a base de

Bacillus subtilis (Serenade® Opti) el que presentó el menor valor de abcpe, aunque fue similar a los tratamientos a base de la cepa IBC-CR18 y oxiclورو de cobre (Figura 2).

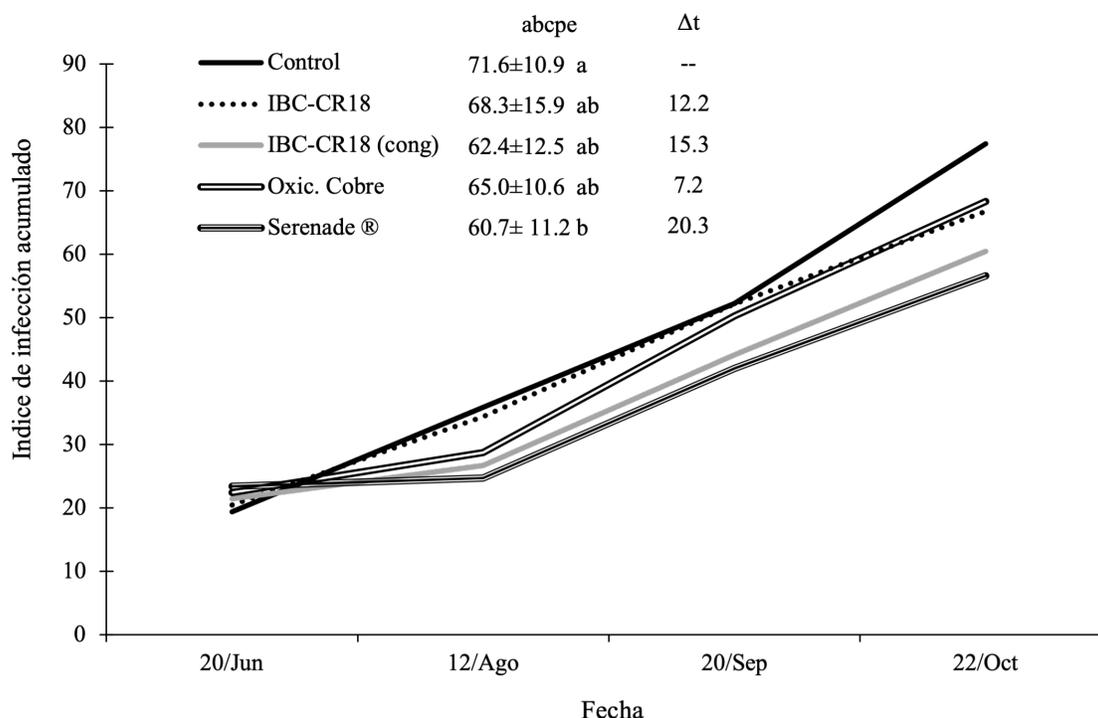


Figura 2. Índices de infección acumulados durante la evaluación en campo de IBC-CR18. Se muestran los valores promedio de área bajo la curva (abcpe) ± desviación estándar por tratamiento y el valor de Δt (días) por tratamiento en comparación con el control. Valores con la misma letra son significativamente iguales ($P>0.05$).

En cuanto al retraso en el progreso de la enfermedad, los tratamientos a base del cultivo crudo y cultivo crudo congelado de la cepa IBC-CR18 mostraron un factor Δt de 12.2 y 15.3 días, mientras que el oxiclورو de cobre y el biofungicida comercial retrasaron la enfermedad por 7.2 y 20.3 días en comparación con el control, respectivamente (Figura 2).

S. marcescens es ampliamente reconocida por tener una destacada actividad antifúngica ante una variedad de fitopatógenos, lo cual es atribuible a su variado metabolismo secundario extracelular que incluye antibióticos (prodigiosina, carbapenémicos, altiomicina), una maquinaria quitinolítica altamente eficiente para degradar la quitina estructural de las paredes celulares fúngicas (enzimas micolíticas), compuestos antifúngicos (oocidina A), compuestos volátiles antifúngicos (sodorifeno) y biosurfactantes (serrawettins), principalmente (Soenens e Imperial, 2020).

De manera general, los trabajos de investigación en campo sobre la evaluación de agentes de biocontrol de *H. vastatrix* son relativamente pocos (Hernández et al., 2021). A pesar de que es un hongo parásito obligado que no puede cultivarse en el laboratorio, se han reportado algunos trabajos que

muestran porcentajes de inhibición *in vitro* en la germinación de las urediniosporas de *H. vastatrix* entre el 50-100%, ocasionados por *Bacillus* spp. y *Pseudomonas fluorescens* (Bettiol y Varzea, 1992; Daivasikamani y Rajanaika, 2009; Shiomi et al., 2006). Algunas cepas de hongos también han sido reportadas como micoparásitos potenciales agentes de biocontrol de *H. vastatrix*, principalmente *Lecanicillium* spp., *Simplicillium* spp., *Calcarisporium* sp., *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Acremonium* sp., *Cladosporium* sp. y *Aspergillus* sp. (Hernández et al., 2021). En el presente trabajo se encontró que las plantas que fueron asperjadas con los cultivos crudos (metabolitos y células) de la bacteria IBC-CR18 mostraron valores de severidad similares a las plantas tratadas con el oxiclورو de cobre, además de causar mayor retraso en el desarrollo de la enfermedad que el fungicida químico. Similarmente, Haddad et al. (2009) encontraron que la aspersión en campo de plantas de café variedad Mundo novo con una suspensión bacteriana de la cepa B157 de *B. subtilis* mostró valores de severidad de roya similares a las plantas tratadas con hidróxido de cobre. Estos resultados ponen de manifiesto la posibilidad de que estos biofungicidas sustituyan a futuro, reduzcan o complementen a los fungicidas químicos, debido

a su actividad quitinolítica sobre las paredes celulares fúngicas (Swiontek et al., 2014) o a la alteración de procesos metabólicos fúngicos que causan los metabolitos extracelulares de la bacteria (Soenens e Imperial, 2020).

Por otro lado, la efectividad de los tratamientos don se usó IBC-CR18 pudo haber sido afectada durante la temporada de lluvias, ocasionando que el tratamiento se haya dispersado en eventos de lluvia intensa que pudiesen lavar el inóculo de las hojas antes de que las bacterias puedan colonizar los tejidos vegetales, considerando que las aplicaciones en campo se realizaron en los meses de junio-octubre. La formulación de estos bioproductos juega un papel clave para poder garantizar resultados favorables de control en el campo, tal como ocurre con los biofungicidas disponibles comercialmente. Por ejemplo, el biofungicida comercial recomendado para roya del café y formulado a base de extractos botánicos de *Melaleuca alternifolia* (Timorex Gold®) redujo significativamente en casi 50% la tasa de infección aparente (r) de la roya y el abcpe en 14% en relación al Testigo (Fajardo-Franco et al., 2020). En el presente estudio, el biofungicida comercial a base de *B. subtilis* (Serenade® Opti) presentó los valores más bajos de abcpe y causó el mayor retraso de la enfermedad con respecto al control (20 días). Con los resultados obtenidos en esta investigación se muestra el potencial de la cepa IBC-CR18 como agente de biocontrol de la roya. Sin embargo, investigación complementaria es requerida para validar los resultados obtenidos, así como también definir las metodologías que permitan escalar su producción y diseñar una formulación adecuada que permita dar más estabilidad y sobrevivencia a la cepa y sus metabolitos en el campo.

4. Conclusión

Los cultivos crudos de la cepa IBC-CR18 de *Serratia marcescens* tienen potencial como agentes de biocontrol de la roya del café y podrían a futuro reducir, sustituir o complementar las aplicaciones de oxiclورو de cobre en el campo.

Los tratamientos a base de la cepa IBC-CR18 (metabolitos más células) y cultivo crudo congelado (metabolitos), retrasaron la enfermedad por 12 y 15 días, respectivamente.

Agradecimientos

Se agradece al propietario de la finca Los Olivos por las facilidades otorgadas para el establecimiento del experimento de campo.

Conflicto de intereses

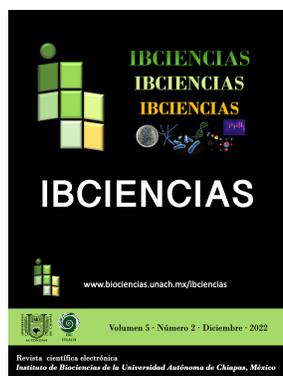
Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias

Achicanoy H. (2000). Descripción cuantitativa de las epidemias de las plantas. Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín 53(1): 941–968.

- Barrera-Gaytán JF, Gómez-Ruiz J. 2019. Plagas y enfermedades del café: características, manejo y retos. En: Bello-Baltazar E, Soto-Pinto L, Huerta-Palacios G, Gómez-Ruiz J. (Eds.), Caminar el cafetal: perspectivas socioambientales del café y su gente. San Cristobal de las Casas, Chiapas, México. ECOSUR. Juan Pablos Editores. Pp. 115–139.
- Barrera-Gaytán JF, Pérez-Quintanilla J, Pinson-Rincón E, Díaz-Vicente VM, y Rivas-Platero GG. 2014. Plagas y enfermedades del café: Identificación, bioecología y manejo agroecológico. México. ECOSUR-UNACH-IICA.
- Barrera JF, Avelino J, Huerta G, Herrera J, Gómez J. 2013. La roya del café, crónica de una decepción anunciada. ECOFRONTERAS 49: 22–25.
- Bettiol W, Varzea V. 1992. Controle biológico da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeiro com *Bacillus subtilis* em condições controladas. Fitopatologia Brasileira 17(1): 91–95.
- Camposeco JD. 2017. Evaluación de las cepas bacterianas FCA-CR10 y FCA-CR18 como agentes de biocontrol de la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chiapas. México.
- Canet Brenes G, Soto Viquez C, Ocampo Thomason P, Rivera Ramírez J, Navarro Hurtado A, Guatemala Morales GM, Villanueva Rodríguez S. 2016. La situación y tendencias de la producción de café en América Latina y el Caribe. IICA-CIATEJ. San José, Costa Rica. 126 p.
- Carlier J, De Waele D, Escalant JV. 2002. Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por *Fusarium*, enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nemátodos: evaluación extensiva. Vézina A, Picq C. (Eds.). Guías técnicas INIBAP 6. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia.
- Daivasikamani S, Rajanaika. 2009. Biological control of coffee leaf rust pathogen, *Hemileia vastatrix* Berkeley and Broome using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Biopesticides 2(1): 94–98.
- Fajardo-Franco ML, Aguilar-Tlatelpa M, Guzmán-Plazola RA. 2020. Biofungicidas evaluation in two coffee cultivars for *Hemileia vastatrix* control. Revista Mexicana de Fitopatología 38(2): 293–306.
- Haddad F, Maffia LA, Mizubuti ESG, Teixeira H. 2009. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. Biological Control 49(2): 114–119.
- Henderson TP. 2019. La roya y el futuro del café en Chiapas. Revista Mexicana de Sociología 81(2): 389–416.
- Hernández C, López L, Sánchez L. 2021. Agentes de control biológico de la roya del café ¿Cómo funcionan y qué tan efectivos son? BioTecnología 25(1): 21–30.
- INEGI. 2017. Anuario estadístico y geográfico de Chiapas 2017. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx>
- Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. Frontiers in Plant Science 10: 845.
- Libert-Amico A, Paz-Pellat F. 2018. Del papel a la acción en la mitigación y adaptación al cambio climático: la roya del cafeto en Chiapas. Madera y Bosques 24: e2401914.
- Mohapatra NK, Mukherjee AK, Rao AVS, Nayak P. 2008. Disease progress curves in the rice blast pathosystem compared

- with the logistic and gompertz models. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science* 3(1): 28–37.
- Pandit MA, Kumar J, Gulati S, Bhandari N, Mehta P, Katyal R, Rawat CD, Mishra V, Kaur J. 2022. Major biological control strategies for plant pathogens. *Pathogens* 11(2): 273.
- Rettinassababady C, Jeyalakshmi C. 2014. Bio-Fungicides: the best alternative for sustainable food security and ecosystem. In: Kharwar RN, Upadhyay RS, Dubey NK, Raghuvanshi R. (Eds.), *Microbial diversity and biotechnology in food security*. Pp. 401–411.
- Shiomi HF, Sandro H, Silva A, Melo ISD, Vieira F, Bettiol W. 2006. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Scientia Agricola* 63(1): 32–39.
- SIAP. 2021. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Producción de café cereza. Disponibl en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Soenens A, Imperial J. 2020. Biocontrol capabilities of the genus *Serratia*. *Phytochemistry Reviews* 19(3): 577–587.
- Swiontek M, Jankiewicz U, Burkowska A, Walczak M. 2014. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. *Current Microbiology* 68(1): 71–81.
- Talhinhas P, Batista D, Diniz I, Vieira A, Silva DN, Loureiro A, Tavares S, Pereira AP, Azinheira HG, Guerra-Guimarães L, Várzea V, Silva MDC. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology* 18(8): 1039–1051.
- Toniutti L, Breitler JC, Etienne H, Campa C, Doubeau S, Urban L, Lambort C, Pinilla JCH, Bertrand, B. 2017. Influence of environmental conditions and genetic background of arabica coffee (*C. arabica* L.) on leaf rust (*Hemileia vastatrix*) pathogenesis. *Frontiers in Plant Science* 8: 2025.
- Van der Plank JE. 1964. *Plant diseases: epidemics and control*. Academic Press. 366 p.
- Whitney PJ. 1976. *Microbial Plant Pathology*. Hutchinson & Co Ltd. London.



Desarrollo del banano variedad “Piña” cultivado con sistema orgánico

Miguel Salvador-Adriano, Alina Villalobos-Hau, Miguel Salvador-Figueroa, Benjamín Moreno-Castillo, María de Lourdes Adriano-Anaya*

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

El banano variedad “Piña” es producido y comercializado en el Soconusco, Chiapas, México. La información sobre el desarrollo de dicha variedad es escasa. El objetivo del presente trabajo fue monitorear el desarrollo del banano variedad “Piña” cultivado bajo un sistema orgánico. Empleando 44 plantas por tratamiento, repartidas en cuatro surcos de 11 plantas, fue estudiado el desarrollo de las plantas con dos estrategias de biofertilización: 1) 5 kg por planta de compost + 2 L por planta de biol y 2) 5 kg por planta de compost + 4 L por planta de biol. El compost fue aplicado cada 56 días y el biol cada 7 días. Las determinaciones altura de planta, perímetro del pseudotallo, número de hojas, número de hijuelos, y estado nutricional (SPAD) de las hojas 4 y 6 fueron realizadas cada 14 días hasta el florecimiento de las primeras plantas. Las plantas biofertilizadas con mayor cantidad de biol alcanzaron la altura máxima en menor tiempo, mayor velocidad de crecimiento, mayor perímetro de pseudotallo, mayor cantidad de hijuelos y florecieron primero. Al florecimiento, no se encontraron diferencias en el número máximo de hojas funcionales, ni en el estado nutricional de las hojas 4 y 6, entre las plantas de los dos tratamientos.

Palabras clave:

Altura de planta
Hijuelo
Hoja funcional
Perímetro de tallo
SPAD

Keywords:

Plant height
Shoot
Functional leaf
Pseudostem perimeter
SPAD

Development of the “Piña” variety banana cultivated with an organic system

Abstract

The “Piña” variety banana is produced and marketed in Soconusco, Chiapas, Mexico. Information on the development of this variety is scarce. The objective of this work was to determine the development of the banana variety “Piña” grown under the organic system. Using 44 plants per treatment, divided into four rows of 11 plants each, the development of the plants was studied with two biofertilization strategies: 1) compost 5 kg per plant, biol 2 L per plant and 2) compost 5 kg per plant, biol 4 L per plant. The compost was used every 56 days and the biol every 7 days. The plant height, pseudostem perimeter, number of leaves, number of suckers, and nutritional status (SPAD) determinations of leaves 4 and 6 were made every 14 days until the flowering of the first plants. The biofertilized plants with the highest amount of biol reached the maximum height in less time, faster growth rate, greater pseudostem perimeter, greater number of shoots and flourished first. Between the plants of the two treatments, no differences were found in the number of maximum functional leaves, and at flowering, and the nutritional status of leaves 4 and 6.

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,
Universidad Autónoma de
Chiapas.
Boulevard Príncipe Akishino
sin número, Colonia
Solidaridad 2000, CP.
30798.
Tapachula, Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9626427972.
Correo-electrónico:
maria.adriano@unach.mx

1. Introducción

El banano es uno de los frutales más cultivados en el mundo (Castillo et al., 2011). México es el 12° productor mundial y, el estado de Chiapas aporta 30.9% de la producción (SAGARPA, 2018). Los cultivos de plátanos y bananos pueden considerarse semi-perennes, ya que, una vez instaladas las plantaciones permanecen de 10 a 20 años sin sustitución. Además, el manejo de estos frutales es realizado cómo un monocultivo con densidades de siembra con un rango de 1500 a 2500 plantas ha⁻¹ (Cedeño-García et al., 2020).

Para crecer y fructificar, el banano requiere de elementos químicos proporcionados por el aire (carbono y oxígeno), el agua (hidrógeno y oxígeno) y el suelo (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre, entre otros). Sin embargo, en un cultivo, la velocidad de extracción de los elementos proporcionados por el suelo es más rápida respecto a los ciclos biogeoquímicos; razón por la cual se agregan fertilizantes químicos (Abreu et al., 2018; Quevedo et al., 2019). Convencionalmente, la fertilidad química del suelo bananero es mantenida por la adición de (ha⁻¹ ciclo⁻¹): 200 - 490 kg de N, 400-860 kg de K₂O, 72-80 kg de P₂O₅ y cantidades variables de elementos menores (Molina-Moreno et al., 2015; Soto, 1991). Además, el cultivo convencional de plátano y banano controla las malezas con herbicidas químicos (1.0 L ha⁻¹ de glifosato y mínimo dos aplicaciones ciclo⁻¹) y plaguicidas químicos para los microorganismos productores de enfermedades (1.25 L ha⁻¹ de clorotalonil). El empleo de los agroquímicos convencionales ha impactado negativamente el ambiente y a la salud tanto de los consumidores como de las personas que manejan el cultivo (Kim et al., 2017; Riccioppo, 2011) y en la calidad del suelo (Arora y Sahni, 2016; Cardona et al., 2016; Singh y Prasad, 2019). Por lo anterior, en el mercado internacional se ha despertado la conciencia sobre el cuidado a la salud y la protección al ambiente, demandando frutos libres de agroquímicos residuales, por lo que la agricultura orgánica es una alternativa para los productores (Vásquez-Castillo et al., 2019).

La agricultura orgánica aprovecha los residuos orgánicos de los cultivos a través de su transformación en abonos, lo que ayuda al crecimiento de las plantas y contribuye a mantener y mejorar las propiedades del suelo (Jara-Samaniego et al., 2021; Ramos y Terry, 2014). Una amplia gama de investigaciones sobre el empleo de fertilizantes orgánicos en el cultivo de café, agave, caña, papaya, arroz, chile, tomate, jitomate, lechuga, trigo, fresa, sorgo, entre otros, ha sido realizada (Márquez-Quiroz et al., 2013; Montero et al., 2010; Steffen et al., 2010). Los plátanos y bananos no han sido la excepción (Capa et al., 2016; Ndukwe et al., 2012; Patil y Shinde, 2013; Silva et al., 2016; Vásquez-Castillo et al., 2019). En todos ellos el empleo de materia orgánica procesada impacta positivamente en las propiedades del suelo y contribuye en el desarrollo de las plantas en cuestión. El banano variedad “Piña” es producido y comercializado en la región Soconusco de Chiapas, México. Escasa es la

información científica respecto a la biología y parámetros de producción de esta variedad de banano. El cultivo de este banano es realizado de manera convencional y en muchas ocasiones simplemente solo es sembrado y cosechado. Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue determinar el desarrollo del banano variedad “Piña” cultivado bajo sistema orgánico.

2. Materiales y métodos

2.1. Lugar de trabajo

El trabajo fue realizado en la estancia agroecológica “Ayol” ubicada en el municipio de Tapachula, Chiapas, México (14°49'48.56''N; 92°17'46.98''O; 58 msnm), durante el ciclo 2019-2020.

2.2. Biofertilizantes

Los biofertilizantes (compost y biofermento líquido) se elaboraron por el método reportado por Molina-Moreno et al. (2015), con modificaciones. La producción de fermento líquido (biol) fue realizada empleando una mezcla de 411 g de cascarones de huevo, 6 kg de cenizas, 1 L de caldo de cultivo conteniendo levadura (*Sacharomyces cerevisiae*; 10⁶ células mL⁻¹), 600 mL de leche de vaca, 6 kg de banano y piña fermentadas, 160 kg de estiércol bovino y suficiente agua para obtener un volumen de 425 L. La mezcla se fermentó anaeróbicamente por 28 días. El compost fue elaborado con residuos vegetales de la estancia agroecológica “Ayol”: hojas y pseudotallo de plátano y banano, frutos sobremadurados y desechados, hojarasca, estiércol fresco de bovino, agua para mantener la humedad entre 80% a 90% y se dejó bajo malla sombra (50%). La mezcla fue humedecida y aireada cada 7 días por un periodo de 84 días. Una vez obtenidos los biofertilizantes se les determinó el contenido de nitrógeno total (Cuadro 1), por el método de Kjendahl, de acuerdo con la SEMARNAT (2002) y de acuerdo con estos resultados se formularon los tratamientos a aplicar conforme al requerimiento nutricional de las plantas.

Cuadro 1. Concentración de nitrógeno (N) en los biofertilizantes empleados en este trabajo.

Biofertilizante	Nitrógeno total
Compost	1.74 g de N kg ⁻¹
Biol	1.59 g de N L ⁻¹

2.3. Material biológico

Se utilizaron 90 hijuelos de 2-3 meses de edad y morfología homogénea de banano variedad “Piña”, obtenidos del rancho “Los Cascabeles” ubicado en el ejido “El Aguacate” en el municipio de Mazatán, Chiapas (14°51'36''N; 92°26'51''O); de clima cálido subhúmedo. Estos hijuelos fueron trasladados a la Estancia Agroecológica “Ayol” en donde se sembraron mediante el sistema tradicional descrito por Soto (1991) con las siguientes modificaciones: Una vez cavadas las cepas, donde se colocaron los cormos, fue adicionado 400 g de cal agrícola con agua para prevenir el desarrollo de

hongos endófitos patógenos y el cormo de cada hijuelo fue lavado y desinfectado con una solución de cloro comercial al 10%. La distribución de los hijuelos fue bajo un sistema de triángulo equilátero, descrito por Soto (1991), resultando en ocho surcos de 11 plantas cada uno. Por último, se agregaron aproximadamente 2 kg de compost alrededor de cada hijuelo.

Los tratamientos establecidos (Cuadro 2) fueron aplicados 6 semanas después de la siembra (SDS) de los hijuelos. Previo a la aplicación de los tratamientos fueron fertilizadas con 1.5 L de biol cada 7 días y 3 kg de compost a la 4 SDS.

Cuadro 2. Descripción de tratamientos de fertilización, dosis y frecuencia de aplicación por planta.				
Tratamientos	Número de plantas	Fertilizantes	Cantidad planta ⁻¹	Frecuencia de aplicación
T1	44	Compost	5 kg	Cada 8 semanas
		Biol	2 L	Cada 7 días
T2	44	Compost	5 kg	Cada 8 semanas
		Biol	4 L	Cada 7 días

2.4. Tratamientos establecidos

Los tratamientos fueron establecidos aleatoriamente, considerando cuatro surcos para el tratamiento uno y cuatro para el tratamiento dos.

2.5. Determinación de variables agronómicas

Las variables agronómicas determinadas a cada una de las plantas de los tratamientos utilizados fueron: altura del pseudotallo (flexómetro Wolfox®) desde el nivel del suelo hasta la intersección de las últimas dos hojas emitidas por la planta; perímetro del pseudotallo (cinta métrica de 150 cm) a 5 cm sobre el nivel del suelo; número de brotes (hijuelos); número de hojas funcionales y; estado de nutrición en Unidades SPAD (Minolta SPAD 502™). Los datos fueron colectados hasta que alguna planta, independiente del tratamiento o del surco, inició el proceso de florecimiento.

2.6. Análisis de datos

El valor promedio de cada variable (de los cuatro surcos), fue utilizado para realizar la comparación entre tratamientos, construyendo gráficas de dispersión. Con esos datos fue realizada la comparación de medias considerando una distribución t-student.

3. Resultados y Discusión

La Figura 1 muestra la cinética de crecimiento (altura del pseudotallo) de las plantas de banano variedad “Piña” bajo los tratamientos de biofertilización utilizados en este trabajo. La curva muestra que las plantas alcanzaron su máximo tamaño después de 13 muestreos (172 días después de iniciado el tratamiento de biofertilización, DDITB) y con forma sigmoidea. La curva de crecimiento tuvo tres fases claramente diferenciadas: la primera con duración de tres muestreos (42 DDITB), denominada etapa de plántula (Torrado-Jaime y Castaño-Zapata, 2008) y sin diferencia significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos; la segunda fase de rápido crecimiento con duración de 7 (96 DDIB) y 6 (84DDITB) muestreos para las plantas del Tratamiento 1 (T1) y Tratamiento 2 (T2), respectivamente, con diferencia significativa ($P < 0.05$) y conocida como etapa de pre-florecimiento (Torrado-Jaime y Castaño-Zapata, 2008) y una etapa final de crecimiento lento con duración de tres

muestreos (42 DDITB) para las plantas del T1 y cuatro muestreos (56 DDITB) para las plantas del T2, sin ninguna denominación y sin diferencia significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos. La altura promedio de las plantas del T2 fue 349 cm y las del T1 fue 328 cm. Las primeras plantas en alcanzar la fase de florecimiento fueron las del T2.

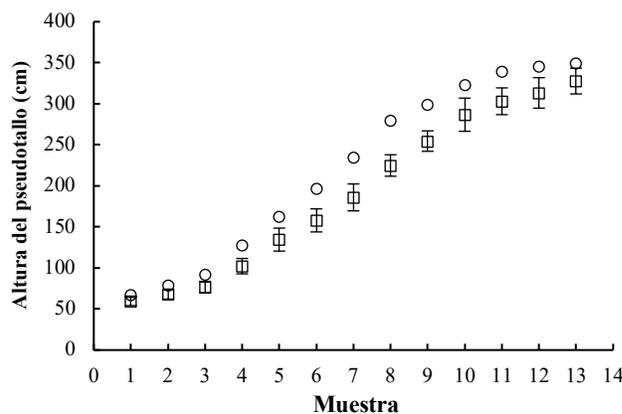


Figura 1. Cinética de la altura del pseudotallo del banano variedad “Piña” cultivado con dos tratamientos de biofertilización. □ = T1, ○ = T2.

Tanto la altura máxima de las plantas como la duración de la etapa de plántula estuvo dentro del rango reportado para plátanos de las variedades “África”, “Dominico Hartón”, FHIA-20 y FHIA-21 (Torrado-Jaime y Castaño-Zapata, 2008) sin embargo, el tiempo invertido en la fase de pre-florecimiento fue la mitad de lo reportado para esas mismas variedades. Por su parte, Martínez y Cayón (2011) reportaron que los bananos de las variedades “Gran Enano” y “Valery” alcanzaron la etapa de florecimiento 173 y 191 días después de la siembra. Las diferencias están asociadas a la variedad de plátano o banano empleada. Así mismo, es reconocido que la altura de las plantas de banano depende de la cantidad de nitrógeno suministrado (Nomura et al., 2017; Torres-Bazurto et al., 2019). Por lo anterior, la diferencia encontrada entre las plantas de los dos tratamientos empleados en este trabajo, pueden deberse a la cantidad de nitrógeno adicionado, aunque, es posible que también estuviese influenciada por los demás componentes del biol.

La fase de pre-floreCIMIENTO de las plantas de los tratamientos empleados se ajustó al modelo lineal con ecuación $Y = 29.424X - 14.115$; $R^2 = 0.99$ para T1 y, $Y = 34.075X - 6.786$; $R^2 = 0.99$ para T2. Por lo anterior la velocidad de crecimiento de las plantas del T2 (34.075 cm muestreo⁻¹ o 2.43 cm día⁻¹) fue 16% mayor respecto a las plantas del T1 (29.494 cm muestreo⁻¹ o 2.1 cm día⁻¹). Tal diferencia pudiera explicar por qué las plantas de T2 florecieron en menor tiempo.

La cinética del perímetro del pseudotallo de las plantas de banano variedad “Piña” mostraron una dinámica similar a la del incremento en altura (Figura 2). Sin embargo, para esta variable las diferencias entre los dos tratamientos de biofertilización utilizados fueron más trascendentales, es decir, se conservaron prácticamente durante todo el ciclo de desarrollo de las plantas y donde el perímetro de las plantas del T2 fue mayor al T1. La ganancia en perímetro también mostró tres fases: una primera fase, con duración coincidente con la etapa de plántula (42 DDIT) y sin diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los tratamientos, la segunda fase con duración de 84 DDIT para ambos tratamientos, coincidente únicamente con la etapa de pre-floreCIMIENTO de las plantas del T2, y diferencia significativa entre ellos, y una etapa de estabilidad, duración de 70 DDIT y con diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos. En etapa de estabilidad, el perímetro de las plantas del T2 (79.73 ± 1.21 cm) fue 10% mayor que el de las plantas del T1 (72.53 ± 1.42 cm). Así mismo, la velocidad de ganancia del perímetro, en la fase coincidente con la de pre-floreCIMIENTO, también se ajustó al modelo lineal con ecuación $Y = 7.774X - 1.795$, $R^2 = 0.98$ para el T1 y; $Y = 7.994X + 6.658$, $R^2 = 0.99$ para T2.

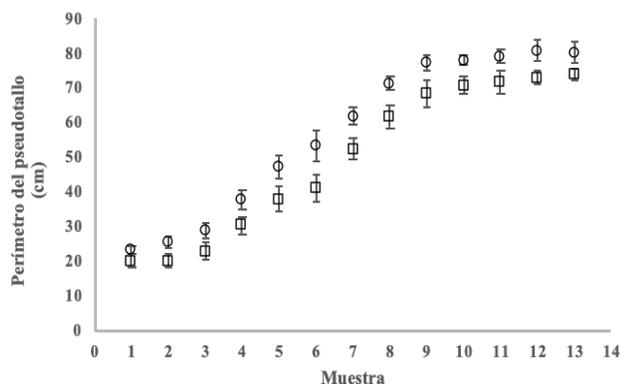


Figura 2. Cinética del perímetro del pseudotallo del banano variedad “Piña” cultivado con dos tratamientos de biofertilización. □ = T1, O = T2.

La variable perímetro, o diámetro, del pseudotallo de las musáceas no ha sido objeto de atención en los trabajos de investigación por lo que la información disponible es escasa. En ese sentido el perímetro del pseudotallo de las plantas de banano variedad “Piña” determinadas en este trabajo fue mayor a lo reportado por Torrado-Jaime y Castaño-Zapata (2008) para plátanos de las variedades “África”, “Dominico

Hartón”, FHIA-20 y FHIA-21, diferencia que puede ser asociada al tipo y variedad de musácea utilizada. Sin embargo, los resultados de este trabajo orientan a pensar en que el perímetro del pseudotallo es una variable que permite detectar diferencias en la disponibilidad de nutrientes en el suelo.

En plátanos y bananos el tiempo invertido para la emisión de brotes, o hijuelos, es una variable de producción que permite obtener material para nuevas áreas de cultivo, renovar las plantaciones existentes y para acortar el ciclo de producción. La Figura 3 muestra que, independientemente del tratamiento de biofertilización, la emergencia de brotes inició 56 DDIB. En promedio las plantas del T1 tuvieron 3.5 brotes planta⁻¹ y las del T2 4.5 brotes planta⁻¹. La diferencia fue significativa ($P < 0.05$). Dicha diferencia es atribuible al tratamiento de biofertilización.

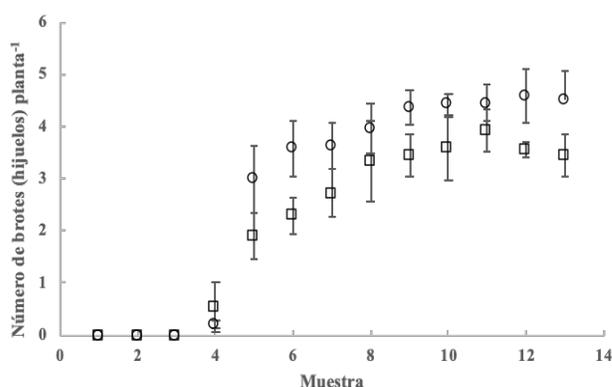


Figura 3. Cinética de emisión de brotes (hijuelos) del banano variedad “Piña” cultivado con dos tratamientos de biofertilización. □ = T1, O = T2.

La emisión de brotes en las plantas de banano variedad “Piña” fue 1.6 a 1.9 veces más rápido que lo reportado por Torrado-Jaime y Castaño-Zapata (2008) para plátanos de las variedades “África”, “Dominico Hartón”, FHIA-20 y FHIA-21. La cantidad máxima de hojas funcionales presentes en las plantas de banano variedad “Piña” alcanzó su máximo valor 98 DDIB, sin diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos (Figura 4). Posteriormente tal variable disminuyó hasta alcanzar un valor casi constante, 10.8 hojas planta⁻¹, durante los últimos 70 DDIB. La disminución de la cantidad de hojas fue resultado de la presencia de síntomas de sigatoka negra y fusariosis, por lo que fueron eliminadas las hojas muy enfermas.

La cantidad de hojas funcionales a florecimiento (HFF), del banano variedad “Piña” fue similar a lo reportado para plátanos de las variedades “África” (9HFF), “Dominico Hartón” (10HFF), FHIA-20 y FHIA-21 (12HFF cada una) (Torrado-Jaime y Castaño-Zapata, 2008) en banano de la variedad “Williams” (5.3 HFF) (Torres-Bazurto et al., 2019) y el banano variedad “Gran Enano” (13HFF) (Soto, 1991). Finalmente, el nivel de nutrición expresada en las hojas 4 y 6 (SPAD), para ambos tratamientos estuvo en el rango de 50 –

61, sin diferencia significativa ($P < 0.05$) y sin variaciones a lo largo del tiempo (Figura 5). La estabilidad de esta variable indica que ambas estrategias de biofertilización proveen de la cantidad de nutrientes requeridos por la variedad de banano objeto de este trabajo.

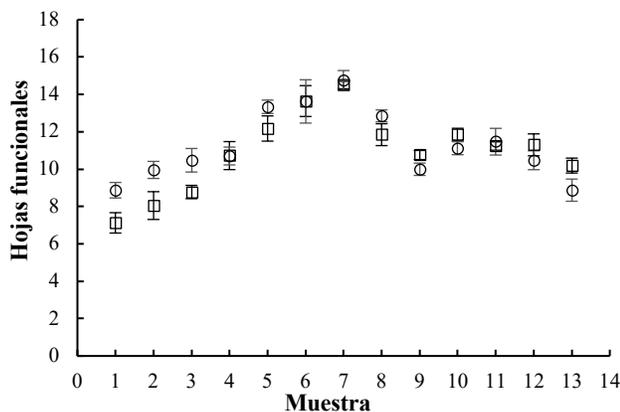


Figura 4. Cinética de hojas funcionales del banano variedad “Piña” cultivado con dos tratamientos de biofertilización. □ = T1, O = T2.

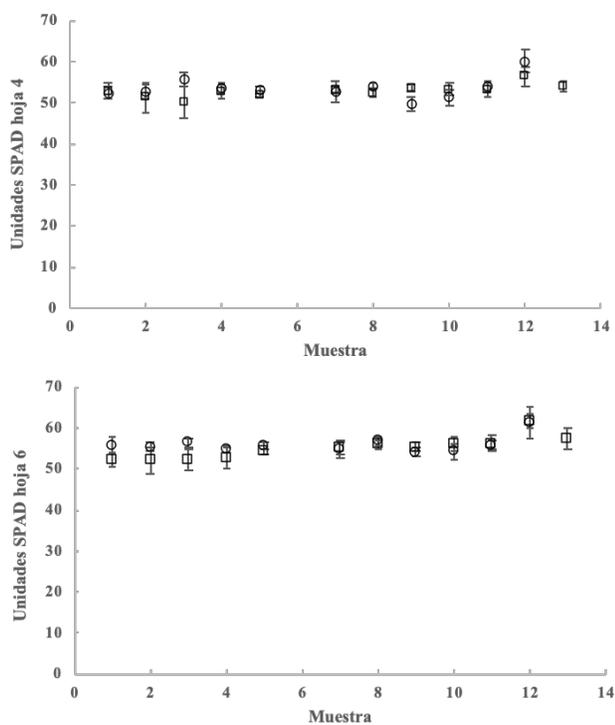


Figura 5. Cinética de las unidades SPAD en las hojas 4 (arriba) y 6 (abajo) funcionales del banano variedad “Piña” cultivado con dos tratamientos de biofertilización. □ = T1, O = T2.

4. Conclusión

Bajo los procedimientos de biofertilización empleados en este trabajo, el banano variedad “Piña” tuvo una altura máxima de 328 cm a 349 cm, perímetro del pseudotallo de 72.53 cm a 79.73 cm, número de hijuelos de 3.5 hijuelos por planta a 4.5

hijuelos por planta, hojas funcionales máximas de 14.75 por planta, hojas al inicio de florecimiento de 10.8 por planta y estado nutricional (SPAD) de 50 a 61, dependiendo del tratamiento. Además, el estadio de plántula tuvo una duración de 42 días y el de pre-florecimiento de 84 días a 96 días. Las primeras plantas con flores fueron observadas 182 días después de iniciado el trabajo. A mayor cantidad de biofertilizante empleado los parámetros altura de planta, perímetro de pseudotallo, velocidad de ganancia de altura y número de brotes, fueron mejorados.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias

- Abreu E, Araujo E, Rodríguez SL, Valdivia A., Fuentes L, Pérez Y. 2018. Effect of combined application of chemical fertilizer and worm humus on *Capsicum annuum*. Centro Agrícola 45(1): 52–61.
- Arora S, Sahni D. 2016. Pesticides effects on soil microbial ecology and enzyme activity-An overview. Journal of Applied and Natural Science 8(2): 1126-1132.
- Capa LB, Alaña TP, Benítez RM. 2016. Importancia de la producción de banano orgánico, caso: provincia El Oro, Ecuador. Universidad y Sociedad 8(3): 64 -71.
- Cardona WA, Bolaños MM, Chavarriaga W. 2016. Effect of chemical and organic fertilizers on the aggregation of a soil grown with *Musa acuminata* AA. Acta Agronómica 65 (2): 144-148.
- Castillo AM, Hernández JA, Avitia E, Pineda J, Valdéz LA, Corona T. 2011. Macronutrient extraction in banana “Dominico” (*Musa spp.*). Phytion 80: 65–72.
- Cedeño-García G, Guzmán-Cedeño A, Zambrano-Lucero H, Vera-Macías L, Valdivieso-López C, López-Álava G. 2020. Efecto de la densidad de siembra y riego complementario en la morfo-fenología, rendimiento, rentabilidad y eficiencia de la fertilización del plátano. Scientia Agropecuaria 11(4): 483-492.
- Jara-Samaniego J, Gallegos J, Cruz A. 2021. Elaboration and characterization of bioles from organic waste. InterSedes 22(45): 189-203.
- Kim K, Kabir E, Jahan S.A. 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. Science of The Total Environment 575: 525-535.
- Martínez AM, Cayón DG. 2011. Dinámica del crecimiento y desarrollo del banano (*Musa* AAA Simmonds cvs. Gran Enano y Valery). Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín 64(2): 6055-6064.
- Molina-Moreno P, Flores-Herrera R, Velázquez-Ovalle G, Adriano-Anaya ML, Ovando-Medina I, Salvador-Figueroa M. 2015. Biofertilización y microbiota del suelo en plantaciones establecidas de banano clon “Gran Enano” (*Musa* AAA). En: Producción sustentable de Banano. (Eds. Adriano M. y Salvador M.). 1ª. Edición. Ed. Fray Bartolomé de Las Casas. Pp. 31-55.
- Márquez-Quiroz C, López-Espinosa ST, Cano-Ríos P, Moreno-Reséndez A. 2013. Fertilización orgánica: Una alternativa para la producción de chile piquín bajo condiciones

- protegidas. Revista Chapingo, Serie Horticultura 19(3): 279-286.
- Martínez AM, Cayón DG. 2011. Dinámica del crecimiento y desarrollo del banano (*Musa* AAA Simmonds cvs. Gran Enano y Valery). Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín 64(2): 6055-6064.
- Montero L, Duarte C, Cun R, Cabrera JA. 2010. Efectividad de biofertilizantes micorrizicos en el rendimiento del pimiento (*Capsicum annuum* l. var. Verano 1) cultivado en diferentes condiciones de humedad del sustrato. Cultivos Tropicales 31(3): 11-14.
- Ndukwe OO, Muoneke CO, Baiyeri KP, Tenkouano A. 2012. Effect of organic and inorganic fertilizers on nutrient concentrations in plantain (*Musa* spp.) fruit pulp. African Journal of Biotechnology 11(7): 1651-1658.
- Nomura ES, Cuquel FL, Damatto ER, Fuzitani EJ, Borges AL. 2017. Fertilization with nitrogen and potassium in banana cultivars 'Grand Naine', 'FHIA 17' and 'Nanicão IAC 2001' cultivated in Ribeira Valley, São Paulo State, Brazil. Acta Scientiarum Agronomy 39(4): 505-513.
- Patil VK, Shinde BN. 2013. Studies on integrated nutrient management on growth and yield of banana cv. Ardhapuri (*Musa* AAA). Journal of Horticulture and Forestry 5(9): 130-138.
- Quevedo JN, Delgado IG, García RM. 2019. Evaluación de la aplicación de fertilizante al pseudotallo de plantas cosechadas de banano (*Musa x paradisiaca* L.) y su efecto en la velocidad de crecimiento del hijo retorno. Revista Científica Agroecosistemas 7(2): 190-197.
- Ramos D, Terry E. 2014. Generalidades de los abonos orgánicos: Importancia del Bocashi como alternativa nutricional para suelos y plantas. Cultivos Tropicales 35(4): 52-59.
- Riccioppo RD. 2011. Agroquímicos: sus efectos en la población-medidas de prevención. Colegio de médicos de la provincia de Buenos Aires, Distrito VII. 19 p.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2018. Atlas Agroalimentario 2012-2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Pp. 130-133.
- SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021.RECNAT-200 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Diario Oficial 7-11; 57-60.
- Silva CN, de Mello R, Castellanos L, Abreu M, Rosatto L. 2016. Fuentes de fosfato asociadas a la cachaza y el biofertilizante sobre los microorganismos solubilizadores de fósforo y su contenido en el suelo. Cultivos Tropicales 37(1): 22-27.
- Singh P, Prasad SM. 2019. Sustenance of soil microbial biomass, the basis of soil fertility in the agro-ecosystems: Influence of pesticide and soil amendments. Plant Archives 19(1): 496-507.
- Soto M. 1991. Siembra y Operaciones del Cultivo. En: Bananos, cultivo y comercialización. 3ª. Edición. Litografía e Imprenta LIL, S.A. Costa Rica. 627 p.
- Steffen GPK, Antonioli ZI., Steffen RB, Machado RG. 2010. Casca de arroz e esterco bovino como substratos para a multiplicação de minhocas e produção de mudas de tomate e alface. Acta Zoológica Mexicana 26(2): 333-343.
- Torrado-Jaime M, Castaño-Zapata J. 2008. Incidencia y severidad de las sigatocas negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y amarilla (*Mycosphaerella musicola* Leach et Mulder) del plátano según los estados fenológicos. Agronomía Colombiana 26(3): 435-442.
- Torres-Bazurto J, Magnitskiy S, Sánchez JD. 2019. Effect of fertilization with N on height, number of leaves, and leaf area in banana (*Musa* AAA Simmonds, cv. Williams). Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas 13(1): 9-17.
- Vásquez-Castillo W, Racines-Oliva M, Moncayo P, Viera W, Seraquive M. 2019. Fruit quality and post-harvest losses of organic bananas (*Musa acuminata*) in Ecuador. Enfoque UTE 10(4): 57-66.