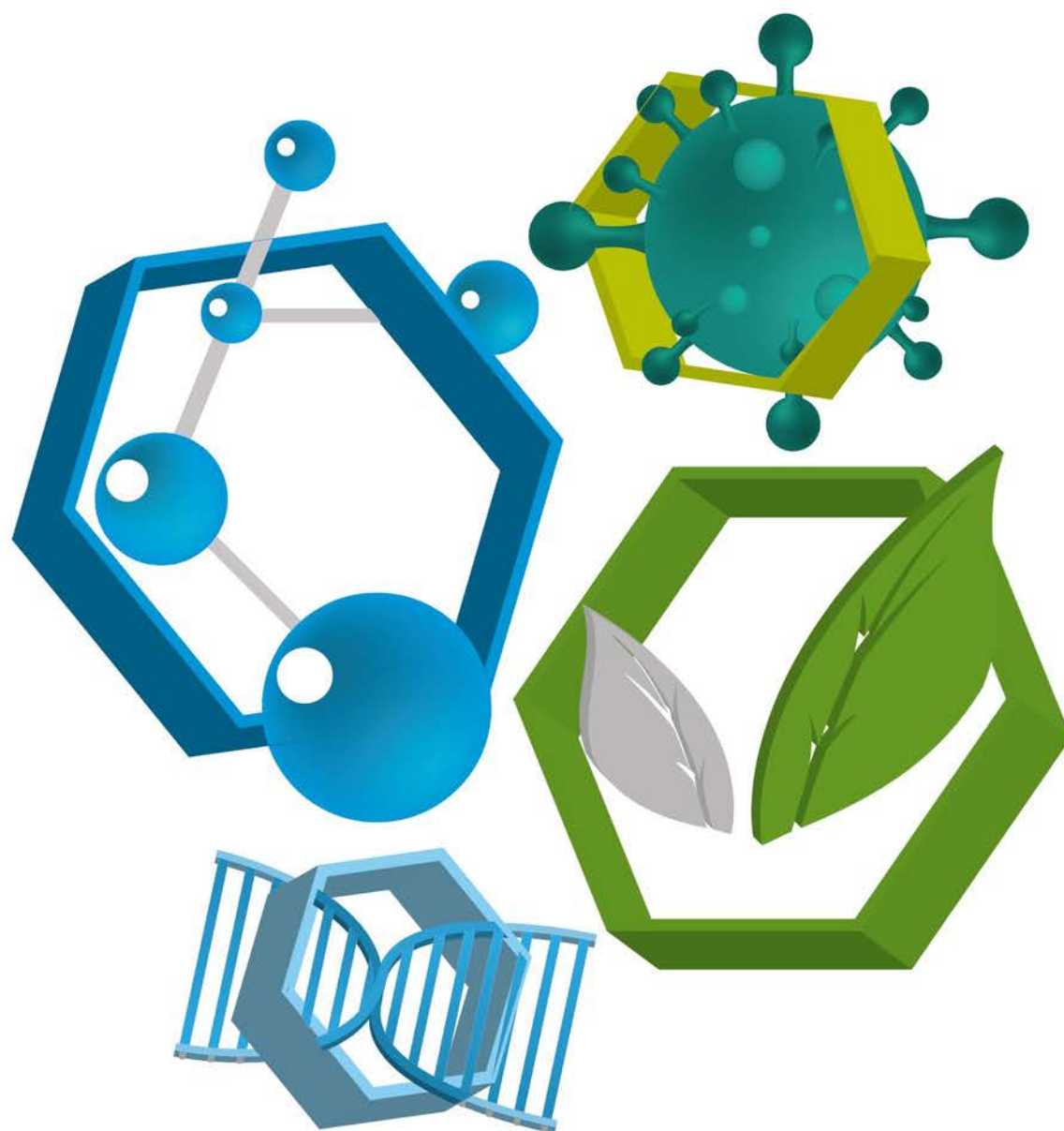


Vol. 6 No. 1 2021

ISSN:1390-9347

Bionatura

Latin American journal of Biotechnology and Life Sciences



V CONGRESO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIODIVERSIDAD 2020
"LA BIOTECNOLOGÍA, ALIADA ESTRATÉGICA EN LA RECUPERACIÓN
AGROINDUSTRIAL POST COVID-19".

Scopus®

UNIVERSIDAD
YACHAY
TECH



clinicalbiotec.com

 **UCO**
Universidad Católica de Oriente

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA
Y BIOMEDICINA
CBB
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA
Y BIOMEDICINA



Es el momento de los que se atreven a
soñar y luchan por alcanzar sus metas.
En la UCO te acompañamos



Vigilada Mineducación

Pregrados

› Tecnología en Operaciones Financieras

SNIES 104841 Registro Calificado - Res. 12903 del 21-09-2015 M.E.N.
96 créditos - A distancia tradicional - Rionegro Ant.

› Contaduría Pública

SNIES 13018 Registro Calificado - Res. 9256 del 07-06-2018
Acreditación de Alta Calidad 4610 del 21-03-2018 M.E.N.
166 créditos Presencial - Rionegro

› Comercio Exterior

SNIES 1854 Registro Calificado - Res. 14314 del 11-12-2019 M.E.N.
159 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Administración de Empresas

SNIES 55096 Registro Calificado - Res. 7658 del 18-04-2017 M.E.N.
152 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Tecnología Agropecuaria

SNIES 1850 Registro Calificado - Res. 8884 del 10-07-2013 M.E.N.
113 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Agronomía

SNIES 4443 Registro Calificado - Res. 8067 del 17-05-2018
Acreditación de Alta Calidad N° 29149 del 26-12-2017
157 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Zootecnia

SNIES 53037 Registro Calificado - Res. 14468 del 04-09-2014 M.E.N.
156 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Psicología

SNIES 8562 Registro Calificado - Res. 9902 del 31-07-2013 M.E.N.
Acreditación de Alta Calidad N° 17227 del 24-10-2018
175 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Comunicación Social

SNIES 53045 Registro Calificado - Res. 14892 del 11-09-2014 M.E.N.
146 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Trabajo Social

SNIES 106586 Registro Calificado - Res. 26741 del 29-11-2017 M.E.N.
141 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Derecho

SNIES 53539 Registro Calificado - Res. 10542 del 14-07-2015 M.E.N.
168 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Nutrición y Dietética

SNIES 104801 Registro Calificado - Res. 7823 del 01-06-2015 M.E.N.
166 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Gerontología

SNIES 1853 Registro Calificado - Res. 14838 del 22-10-2013 M.E.N.
138 créditos - A distancia con apoyo Virtual - Rionegro Ant.

› Enfermería

SNIES 91027 Registro Calificado - Res. 12600 del 03-06-2018 M.E.N.
166 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Licenciatura en Filosofía

SNIES 105542 Registro Calificado - Res. 22108 del 24-10-2017 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Licenciatura en Lenguas Extranjeras con énfasis en Inglés

SNIES 106647 Registro Calificado - Res. 29529 del 29-12-2017 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Licenciatura en Educación Física, Recreación y Deportes

SNIES 106436 Registro Calificado - Res. 17481 del 31-08-2017 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Licenciatura en Educación para la Primera Infancia

SNIES 105359 Registro Calificado - Res. 02848 del 16-02-2016 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Licenciatura en Ciencias Naturales

SNIES 106896 Registro Calificado - Res. 19869 del 18-10-2016 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Licenciatura en Educación Religiosa

SNIES 106705 Registro Calificado - Res. 2084 del 13-02-2018 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Técnico Profesional en Programación Web

SNIES 103704 Registro Calificado - Res. 14454 del 04-09-2014 M.E.N.
67 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Ingeniería Ambiental

SNIES 4361 Registro Calificado - Res. 3654 del 02-03-2018 M.E.N.
Acreditación de Alta Calidad No. 6543 del 18-04-2018
173 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Ingeniería de Sistemas

SNIES 1855 Registro Calificado - Res. 0178 del 05-01-2019 M.E.N.
164 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Ingeniería Industrial

SNIES 1856 Registro Calificado - Res. 1293 del 04-02-2019 M.E.N.
160 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Ingeniería Electrónica

SNIES 20271 Registro Calificado - Res. 24646 del 14-11-2017 M.E.N.
178 créditos - Presencial - Rionegro Ant.

› Teología

SNIES 103450 Registro Calificado - Res. 10638 del 09-07-2014 M.E.N.
130 créditos - A distancia - Rionegro Ant.

¡HAGAMOS QUE PASE!



El Centro de Biotecnología de la ESPOL, CIBE

Genera, aplica, transfiere y difunde las soluciones biotecnológicas que demanda el sector agroindustrial de la costa ecuatoriana.

Sus fortalezas se enfocan en servicios de análisis o de investigación aplicada que puedan proveer soluciones a problemas particulares de la agricultura.

Tipos de ensayos

- Clínica de plantas.
- Servicios analíticos.
- Servicios de bioensayos.

Servicios más requeridos

- Diagnóstico de enfermedades en cultivos agrícolas.
- Estudio de sensibilidad de Sigatoka Negra a fungicidas.
- Cuantificación de fitohormonas, perfil de ácidos grasos por CG-EM.
- Cuantificación de polifenoles y flavonoides, actividad antioxidante.
- Extensión agrícola.

Productos que puede evaluar

- Cultivos agrícolas con presencia de enfermedades causadas por patógenos (bacterias, virus y hongos).
- Bioproductos o bioinsumos con impacto en el rendimiento de cultivos.
- Fungicidas o productos similares para el control de Sigatoka Negra.

Nuestra visión es ser el líder nacional en biotecnología en beneficio del desarrollo de la sociedad ecuatoriana.



Bionatura



La Revista Bionatura publica trimestral en español o inglés trabajos inéditos de investigaciones básicas y aplicadas en el campo de la Biotecnología, la Inmunología, la Bioquímica, Ensayos Clínicos y otras disciplinas afines a las ciencias biológicas, dirigidas a la obtención de nuevos conocimientos, evaluación y desarrollo de nuevas tecnologías, productos y procedimientos de trabajo con un impacto a nivel mundial.

1442

Equipo editorial

Editor Jefe / Chief Editor

Dr. Nelson Santiago Vispo, Ph.D. Research / Full Professor. Yachay Tech University, Ecuador. Member of the European Association of Science Editors (EASE) and Council of Science Editors (USA).

Principal Editorial Board / Consejo Editorial Principal

Dr. Fernando Albericio, Ph.D. Full Professor. University of KwaZulu-Natal, Durban, South Africa.

Dr. Spiros N. Agathos, Ph.D. Full Professor. Université Catholique de Louvain - UCLouvain, Louvain-la-Neuve, Belgium.

Dra. Hortensia María Rodríguez Cabrera, Ph.D. Full Professor and Dean, School of Chemical Sciences and Engineering Yachay Tech University, Ecuador.

Dr. Frank Alexis, Research / Full Professor. Vice Chancellor Of Research and Innovation. Yachay Tech University, Ecuador.

Consejo Editorial / Editorial Board

Dr. Gerardo Ferbeyre, Full Professor. Département de biochimie. Faculté de Médecine. Université de Montréal, Canadá.

Dr. Frank Camacho Casanova, Ph.D., Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción, Chile.

Dr. Eduardo López Collazo, Director IdiPAZ Institute of Biomedical Research, La Paz Hospital, España.

Dr. Yovani Marrero-Ponce, Ph.D. Full Professor. Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Quito, Ecuador.

Dr. Manuel Limonta, Prof. PhD. Director: Regional Office for Latin American and the Caribbean International Council for Science (ICSU). Doctor honoris causa Autonomous Metropolitan University of México City (UAM), Dr. Honoris Causa - Universidad Central Ecuador.

Dr. Dagoberto Castro - Restrepo, Prof. PhD. Research and Development Director. Universidad Católica del Oriente, Rio Negro, Colombia

Dr. Michael Szardenings, Ph.D. Ligand Development Unit. Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology, Germany.

Dra. Luciana Dente, Research Professor University of Pisa, Italy.

Dr. Costantino Vetriani, Research / Full Professor. Rutgers, The State University of New Jersey, USA.

Dr. Si Amar Dahoumane, Ph.D. Research / Professor. Yachay Tech University, Ecuador.

Dr. Amit Chandra, MD, MSc, FACEP Global Health Specialist, Emergency Physician Millennium Challenge Corporation, London School of Economics and Political Science.

Dr. Silvio e. Perea, Ph.D. Head of the Molecular Oncology Laboratory, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba.

Dra. Daynet Sosa del Castillo, Ph.D. Directora del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador. CIBE-ESPOL.

Dra. Consuelo Macías Abraham, Especialista de II Grado en Inmunología, Investigadora y Profesora Titular, Doctora en Ciencias Médicas y Miembro Titular de la Academia de Ciencias de Cuba. Directora del Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), de La Habana, Cuba.

Dr. René Delgado, Ph.D. IFAL / Presidente Sociedad Cubana de Farmacología, Cuba.

Dr. Ramón Guimil, Senior Director. Oligonucleotide Chemistry bei Synthetic Genomics, Estados Unidos.

Dr. Eduardo Penton, MD, PhD, Investigador Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba.

Dr. Julio Raúl Fernández Massó, PhD, Investigador Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba

Dra. Lisset Hermida, Investigadora Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba.

Dr. Tirso Pons, Staff Scientist. Structural Biology and Biocomputing Programme (CNIO), España.

Dr. Che Serguera, French Institute of Health and Medical Research, MIRCen, CEA, Fontenay-aux-Roses Paris, France.

Dr. Jorge Roberto Toledo, Profesor Asociado. Universidad de Concepción, Chile.

Dr. Oliberto Sánchez, Profesor Asociado. Universidad de Concepción, Chile.
Dr. Aminael Sánchez Rodríguez, Ph.D. Director del departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
Dra. Maritza Pupo, Profesora investigadora. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, Cuba.

Dr. Fidel Ovidio Castro, Founder, Profesor investigador. Tecelvet, Chile.
Dra. Olga Moreno, Partner, Head Patent Division. Jarry IP SpA, Chile.

Dr. Carlos Borroto, Asesor de Transferencia de Tecnología. Dirección General at Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY), México.
Dr. Javier Menéndez, Manager Specialist Process and Product 5cP. Sanoft Pasteur, Canadá.

Dr. Pedro Valiente, Profesor investigador. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, Cuba.

Dr. Diógenes Infante, Prometeo / SENESCYT. Especialista de primer nivel en Biotecnología. Universidad de Yachay Tech, Ecuador.

Dra. Georgina Michelena, Profesora Investigador. Organización de las Naciones Unidas. (ONU), Suiza.

Dr. Francisco Barona, Profesor Asociado. Langebio Institute, México
Dr. Gustavo de la Riva, Profesor Investigador Titular. Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, México.

Dr. Manuel Mansur, New Product Introduction Scientist (NPI) at Elanco Animal Health Ireland, Irlanda.

Dr. Rolando Pajón, Associate Scientist, Meningococcal Pathogenesis and Vaccine Researc. Center for Immunobiology and Vaccine Development, UCSF Benioff Children's Hospital Oakland", Estados Unidos.

Dra. Ileana Rosado Ruiz-Apodaca, Profesor / Investigador. Universidad de Guayaquil, Ecuador.

Dr. Carlos Eduardo Giraldo Sánchez, PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia.

Dr. Mario Alberto Quijano Abril, PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia.

Dr. Felipe Rojas Rodas, PhD, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia.

Dra. Isabel Cristina Zapata Vahos, Profesor / Investigador. Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia.

Dr. Felipe Rafael Garcés Fiallos, PhD, Profesor / Investigador. Vicerrectorado de Investigación, Gestión Social del Conocimiento y Posgrado Universidad de Guayaquil (UG), Ecuador.

Dra. Celia Fernandez Ortega, PhD. Investigadora Titular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Editora ejecutiva Biotecnología Aplicada, Cuba.

Dra. Ligia Isabel Ayala Navarrete, PhD. Profesor / Investigador. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Ecuador.

Dr. Nalini kanta Sahoo, PhD. Professor & Head Department Marri Laxman Reddy Institute of Pharmacy, Hyderabad, Andhra Pradesh, India.

Dr. Saman Esmailnejad, Ph.D. Department of medical sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Dr. Olukayode Karunwi, Ph.D. Research / Professor. Clemson University, Clemson, United States.

Associate Editor / Editor Asociado

Victor Santiago Padilla.

Redacción y Edición / Copyediting and corrections

Mg. Frey A. Narváez-Villa, Jefe del Fondo Editorial Universidad Católica de Oriente. Rionegro-Antioquia/Colombia.

MSc. José Enrique Alfonso Manzanet.

Diseño y Realización gráfica / Graphic design and production

DI. José Manuel Oubiña González.

Relaciones Públicas / Public relations

Camila Barranco Rodriguez.

Asistente de publicación / Publication assistant

Evelyn Padilla Rodriguez.

Instrucciones para los Autores

Los Trabajos serán Inéditos: Una vez aprobados, no podrán someterse a la consideración de otra revista, con vistas a una publicación múltiple, sin la debida autorización del Comité Editorial de la Revista. La extensión máxima será 8 cuartillas para los trabajos originales, 12 las revisiones y 4 las comunicaciones breves e informes de casos, incluidas las tablas y figuras. Los artículos se presentarán impresos (dos ejemplares). Todas las páginas se numerarán con arábigos y consecutivamente a partir de la primera. Estos deben acompañarse de una versión digital (correo electrónico o CD) en lenguaje Microsoft Word, sin sangrías, tabuladores o cualquier otro atributo de diseño (títulos centrados, justificaciones, espacios entre párrafos, etc.). Siempre se ha de adjuntar la carta del consejo científico que avala la publicación y una declaración jurada de los autores.

Referencias Bibliográficas. Se numerarán según el orden de mención en el texto y deberán identificarse mediante arábigos en forma exponencial. Los trabajos originales no sobrepasarán las 20 citas; las revisiones, de 25 a 50 y las comunicaciones breves e informes de casos.

En las Referencias en caso de que las publicaciones revisadas esten online se debe proveer un enlace consistente para su localización en Internet. Actualmente, no todos los documentos tienen DOI, pero si lo tienen se debe incluir como parte de la referencias. Si no tuviese DOI, incluir la URL.

Tablas, modelos y anexos: Se presentarán en hojas aparte (no se intercalarán en el artículo) y en forma vertical numeradas consecutivamente y mencionadas en el texto. Las tablas se ajustarán al formato de la publicación se podrán modificar si presentan dificultades técnicas.

Figuras: Las fotografías, gráficos, dibujos, esquemas, mapas, salidas de computadora, otras representaciones gráficas y fórmulas no lineales, se denominarán figuras y tendrán numeración arábica consecutiva. Se presentarán impresas en el artículo en páginas independientes y en formato digital con una resolución de 300 dpi. Todas se mencionarán en el texto. Los pies de figuras se colocarán en página aparte. El total de las figuras y tablas ascenderá a 5 para los trabajos originales y de revisión y 3 para las comunicaciones breves e informes de casos.

Abreviaturas y siglas: Las precederá su nombre completo la primera vez que aparezcan en el texto. No figurarán en títulos ni resúmenes. Se emplearán las de uso internacional.

Sistema Internacional de Unidades (SI): Todos los resultados de laboratorio clínico se informarán en unidades del SI o permitidas por este. Si se desea añadir las unidades tradicionales, se escribirán entre paréntesis. Ejemplo: glicemia: 5,55 mmol/L (100 mg/100 mL).

Para facilitar la elaboración de los originales, se orienta a los autores consultar los requisitos uniformes antes señalados disponibles en: [http://www.fisterra.com/recursos_web/mbelvancouver.htm#ilustraciones%20\(figura\)](http://www.fisterra.com/recursos_web/mbelvancouver.htm#ilustraciones%20(figura))

Los trabajos que no se ajusten a estas instrucciones, se devolverán a los autores. Los aceptados se procesarán según las normas establecidas por el Comité Editorial. El arbitraje se realizará por pares y a doble ciego en un período no mayor de 60 días. Los autores podrán disponer de no más de 45 días para enviar el artículo con correcciones, se aceptan hasta tres reenvíos. El Consejo de Redacción se reserva el derecho de introducir modificaciones de estilo y/o acotar los textos que lo precisen, comprometiéndose a respetar el contenido original.

El Comité Editorial de la Revista se reserva todos los derechos sobre los trabajos originales publicados en esta.

Bionatura

La **Revista Bionatura** es un medio especializado, interinstitucional e interdisciplinario, para la divulgación de desarrollos científicos y técnicos, innovaciones tecnológicas, y en general, los diversos tópicos relativos a los sectores involucrados en la biotecnología, tanto en Ecuador como en el exterior; así mismo, la revista se constituye en un mecanismo eficaz de comunicación entre los diferentes profesionales de la biotecnología.

Es una publicación sin ánimo de lucro. Los ingresos obtenidos por publicidad o servicios prestados serán destinados para su funcionamiento y desarrollo de su calidad de edición. (<http://revistabionatura.com/media-kit.html>)

Es una revista trimestral, especializada en temas concernientes al desarrollo teórico, aplicado y de mercado en la biotecnología.

Publica artículos originales de investigación y otros tipos de artículos científicos a consideración de su consejo editorial, previo proceso de evaluación por pares (peer review) sin tener en cuenta el país de origen.

Los idiomas de publicación son el Español e Inglés.

Los autores mantienen sus derechos sobre los artículos sin restricciones y opera bajo la política de Acceso Abierto a la Información, bajo la licencia de Creative Commons 4.0 CC BY-NC-SA (Reconocimiento-No Comercial-Compartir igual).

Esta revista utiliza Open Journal Systems, que es un gestor de revistas de acceso abierto y un software desarrollado, financiado y distribuido de forma gratuita por el proyecto Public Knowledge Project sujeto a la Licencia General Pública de GNU.

Nuestros contactos deben ser dirigidos a:
Revista Bionatura: editor@revistabionatura.com

ISSN: 1390-9347 (Versión impresa)
Formato: 21 x 29,7 cm

ISSN: 1390-9355 (Versión electrónica)
Sitio web: <http://www.revistabionatura.com>

Publicación periódica trimestral
Esta revista utiliza el sistema peer review para la evaluación de los manuscritos enviados.

Instrucciones a los autores en:
<http://revistabionatura.com/instrucciones.html>

Asistente de publicación / Publication assistant
Evelyn Padilla Rodriguez (sales@revistabionatura.com)

ÍNDICE / INDEX

EDITORIAL

Nuestro lema: "La Biotecnología, aliada estratégica en la recuperación agroindustrial post COVID-19" 1448

Daynet Sosa del Castillo

LETTER TO EDITOR / CARTA AL EDITOR

The role of science in our society 1451

Julio A. Bonilla Jaime

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Optimización en la aclimatación de plántulas micropropagadas de banano (*Musa sp.*) utilizando tres insumos orgánicos 1452
Optimization in the acclimatization of banana micro propagated seedlings (Musa sp.) using three organic inputs

Andy Fabricio Mora-González, Jaime Alberto Naranjo-Morán, Alexander Albiño-Quitiaquez, José Alcides Flores-Cedeño, Rodrigo Oviedo-Anchundía, Luis Galarza-Romero, Marisol Vera-Oyague, Vicente Painii-Montero, Milton Senen Barcos-Arias

Genetic transformation of apical meristematic shoots in the banana cultivar 'Williams' 1462

Liliana Villao, José Flores, Efrén Santos-Ordóñez

Evaluación del efecto antagónico de una biopelícula con extractos de *Samanea saman* frente a *Colletotrichum gloeosporioides* responsable de la antracnosis en mango 1466
Evaluation of the antagonistic effect of a biofilm with extracts of Samanea saman against Colletotrichum gloeosporioides responsible for anthracnose in mango

Miguel Moreno Paredes, Lenín Ramírez-Cando, Elisa Cedeño Luzardo

Selección de variedades de frijol común rojo (*Phaseolus vulgaris* L.), tolerantes a la sequía en diferentes condiciones de riego en campo 1473
Selection of varieties of common red bean (Phaseolus vulgaris L.), tolerant to drought in different irrigation conditions in the field

Amalia Domínguez Suárez, Rodolfo Darías Rodríguez, Yordany Martínez Dávalos, Maryla Sosa del Castillo y Daynet Sosa del Castillo

Remoción de cinco productos farmacéuticos catalogados como contaminantes emergentes en medio acuoso utilizando la especie vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) 1478
Removal of five pharmaceutical products classified as emerging pollutants in aqueous medium using the vetiver species (Chrysopogon zizanioides)

Miriam Checa-Artos, Daynet Sosa del Castillo, Eulalia Vanegas María, Omar Ruiz-Barzola, Milton Barcos-Arias

Phytochemical screening and antioxidant activity of <i>Epidendrum nocturnum</i>	1486
<i>Fernando Mencias, Telmo Salazar, Marco Cerna</i>	
Chemical Pretreatments on Residual Cocoa Pod Shell Biomass for Bioethanol Production	1490
<i>Jose F. Alvarez-Barreto, Fernando Larrea, Maria C. Pinos C, Jose Benalcázar, Daniela Oña, Daniela A. Viteri, Marco Leon, Daniela Almeida-Streitwieser D.</i>	
Líquenes como biosensores para la evaluación de contaminación atmosférica urbana y sub urbana en un valle de montaña tropical, Rionegro, Antioquia. <i>Lichens as biosensors for the evaluation of urban and sub-urban air pollution in a tropical mountain valley, Rionegro, Antioquia</i>	1501
<i>Mario Alberto Quijano Abril, Diana Marcela Ramírez Ospina, María Isabel Domínguez Rave, James Londoño Valencia</i>	
Optimization of the micropropagation of elite adult trees of <i>Sequoia sempervirens</i> : forest species of interest in the Basque Country, Spain	1511
<i>Alejandra Rojas Vargas, Castander-Olarieta A, Moncaleán P., Montalbán I.A.</i>	
<i>Solanum betaceum</i> in vitro seed germination and seedling development in response to pregerminative treatments	1520
<i>Salazar-Vega, K. S.; Vaca, I.</i>	
Evaluación de la diversidad genética de una colección venezolana de morera mediante marcadores moleculares <i>Evaluation of the genetic diversity of a Venezuelan collection of mulberry using molecular markers</i>	1524
<i>Ramón Rea, Sandy Molina-Moret, Darío Torrealba, Sabino Jiménez, Laura Gelves y Daynet Sosa</i>	
Porous Sponges from the Mesocarp of <i>Theobroma Cacao</i> L. Pod Shells for Potential Biomaterial Applications	1529
<i>Sandra Heredia, Diego Costa, Iván Choez, Ana Barragan, María F. Quijano, Washington Cárdenas, Patricia Manzano, Carol Reyes, Daynet Sosa, Jose F. Alvarez-Barreto</i>	
Analysis of <i>Pseudocercospora fijiensis</i> genes upregulated during early interaction with <i>Musa acuminata</i> (var. Dwarf Cavendish)	1540
<i>Bartolomé Chí Manzanero, Karla Gisel Carreón Anguiano, Jewel Nicole Anna Todd, Rufino Gómez Tah, Rosa Grijalva Arango, Miguel A. Tzec Simá, Blondy Canto Canché</i>	
Avances en tecnologías de propagación y domesticación de plantas de interés económico y ambiental en Argentina <i>Advances in technologies for propagation and domestication of plants of economic and environmental interest in Argentina</i>	1547
<i>C. Weber, M. Cellini, V. Lien, P. Boeri, L. Roussy, P. Sceglío, D. Ramilo, S. Galarco, E. S. Sharry</i>	
Interactoma de predisposición y resistencia a SARS-CoV-2. Proteínas, genes y funciones. <i>Interactome of predisposition and resistance to SARS-CoV-2. Proteins, genes, and functions.</i>	1555
<i>César Paz-y-Miño, Ana Karina Zambrano, Paola E. Leone</i>	

Caracterización química y nutricional de harina de chañar de diferente distribución geográfica <i>Chemical and nutritional characterization of chañar flour from different geographical distribution</i>	1563
<i>Jl. Maschio, P. Boeri, D. Dalzotto, L. Piñuel, S. Sharry</i>	
Pathogenicity of <i>Moniliophthora roreri</i> isolates from selected morphology groups in harvested cacao pods and in vitro sensitivity to compost tea	1569
<i>María Gabriela Maridueña-Zavala, María Isabel Jimenez Feijoo, Juan Manuel Cevallos-Cevallos</i>	
Estudio exploratorio de bacterias solubilizadoras de fósforo en dos hábitats asociados a <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz (cedro andino) <i>An approach in the search for phosphorus-solubilizing bacteria in two habitats associated with Cedrela montana Moritz ex Turcz (Andean cedar)</i>	1575
<i>Tanya Ascencio-Lino, Esther Matamoros-Alcívar, Verónica Sandoya-Sánchez, Milton Barcos-Arias, Jaime Naranjo-Morán</i>	
Chemical evaluation and anti-radical activity of varieties of <i>Morus alba</i> L. (<i>morera</i> , <i>moraceae</i>) from Venezuela	1579
<i>Daynet Sosa del Castillo, José Johnatan Quintero Mesa, Yeifre José Rojas Alvear, María Rodríguez, Ramón Antonio Rea Suárez y Migdalia Miranda Martínez</i>	
Assessing the predatory activity of <i>Arthrobotrys oligosporus</i> strain C-2197 as biocontrol of the root-knot nematode <i>Meloidogyne</i> spp.	1586
<i>Adela Quevedo, Marcos Vera-Morales, Fernando Espinoza-Lozano, Rafael F. Castañeda-Ruiz, Daynet Sosa, Freddy Magdama</i>	
Genomic benchmarking studies reveal variations of the polyubiquitination domain of the PSD95 protein in <i>Homo neanderthalensis</i> and other primates of the Hominidae family: Possible implications in cognitive functions?	1593
<i>Michael Suarez-Chamba, Luis Puma, Jorge Bermeo, Eugenio Andrade, Stalin A. Bermúdez-Puga & Leopoldo Naranjo-Briceño</i>	
Protein recovery from residual bovine whey: Influence of acid thermo-coagulation	1602
<i>Victoria E. García Casas, Jeffrey Vargas Pérez, Roberto Sánchez Companioni, Nardy Diez García</i>	
CASE REPORTS / REPORTE DE CASO	
Fungoide Mycosis. Case report	1608
<i>Irene Rojas Rondón, Lázaro Vigoa Aranguren, Maritza Miquelí Rodríguez, María de Lourdes Guzmán Martínez, Manuel Alejandro Múzquiz Jiménez</i>	
Experiencia en fracturas de clavícula medioclavicular con placa de reconstrucción en posición anteroinferior en pacientes del Hospital José Carrasco Arteaga, IESS 2017 Cuenca – Ecuador <i>Experience in midshaft clavicle fractures with anteroinferior plating technique in patients of Jose Carrasco Arteaga Hospital, IESS 2017 Cuenca –Ecuador</i>	1612
<i>Wladimir Augusto Serrano Barbecho, Jennifer Paola Pacheco Rodríguez</i>	

REVIEW / ARTÍCULO DE REVISIÓN

Presencia de productos farmacéuticos en el agua y su impacto en el ambiente 1618
Presence of pharmaceutical products in water and its impact on the environment

Miriam Checa Artos, Daynet Sosa del Castillo, Oma Ruiz Barzola, Milton Barcos-Arias

Amphibian chytridiomycosis, a lethal pandemic disease caused by the killer fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*: New approaches to host defense mechanisms and techniques for detection and monitoring 1628

Génesis L. Romero-Zambrano, Stalin A. Bermúdez-Puga, Alex F. Sánchez-Yumbo, Jomira K. Yáñez-Galarza, H. Mauricio Ortega-Andrade, and Leopoldo Naranjo-Briceño

Bioproductos desarrollados a partir de micelio de hongos: 1637
Una nueva cultura material y su impacto en la transición hacia una economía sostenible
*Bioproducts developed from fungal mycelium:
A new material culture and its impact on the transition to a sustainable economy*

*Kevin Feijóo-Vivas, Stalin A. Bermúdez-Puga, Hernán-Rebolledo, José Miguel Figueroa,
Pablo Zamora & Leopoldo Naranjo-Briceño*

Potential bioactive compounds of medicinal plants against new Coronavirus (SARS-CoV-2): A review 1653

*Patricia Isabel Manzano - Santana, Juan Pablo Peñarreta Tivillin, Iván Andrés Chóez-Guaranda,
Ana Délica Barragán Lucas, Andrea Katherine Orellana - Manzano, Luca Rastrelli*

NEWS AND VIEWS / NOTICIAS Y OPINIONES

El potencial de la biodiversidad nativa para el desarrollo de la bioeconomía regional- El caso del calafate 1659
The potential of native biodiversity for the development of the regional bioeconomy- The case of Calafate

D. Dalzotto, L. Piñuel, P. Boeri, S. Sharry

Colección de cultivos microbianos CIBE (CCM-CIBE): 1664
Una colección para la investigación
*Microbial Culture Collection from CIBE (CCM-CIBE):
A collection for research*

Maria Gabriela Maridueña-Zavala, Adela Quevedo, Karla Aguaguña, Lissette Serrano, Daynet Sosa

EDITORIAL

Nuestro lema: "La Biotecnología, aliada estratégica en la recuperación agroindustrial post COVID-19"

Daynet Sosa del Castillo

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.1

1448

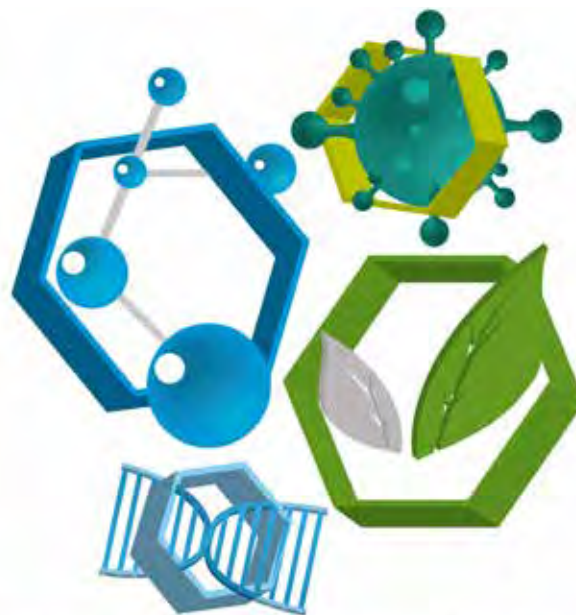
Después de la pandemia nos dimos cuenta de que el sector agrícola nunca detuvo sus actividades, que todos necesitamos de los productos que nuestros agricultores cosechan y hoy más que nunca estamos viendo a la ciencia en general y a la biotecnología en particular, no como resultado final sino como un proceso de colaboración entre los científicos y la industria para aportar soluciones tecnológicas y creativas a este problema urgente en el cual estamos inmersos como humanidad.

En este marco conceptual, el V CIBB 2020 – modalidad virtual renovó el esfuerzo que a lo largo de 15 años ha venido realizando la ESPOL a través de su centro de Biotecnología (CIBE) en la promoción de la biotecnología ecuatoriana; evento que se constituyó en la continuación de los Congresos I CIBB 2012, II CIBB 2014, III CIBB 2016 y IV CIBB 2018, igualmente heredero de una elevada calidad y excelencia académica; y celebrado con total éxito durante los días 5, 6, 7 y 8 de octubre del presente año. Congreso coorganizado por la Asociación de exportadores de banano del Ecuador (AEBE) y realizado en paralelo a la XVII Convención internacional del banano.

A esta convocatoria asistieron más de 200 personas, entre investigadores, estudiantes, empresarios y organismos del Estado. Los ponentes invitados, 15 expertos nacionales y 30 internacionales, todos ellos de gran prestigio científico a nivel mundial realizaron sus ponencias sobre temas de punta en biotecnología, tales como genómica, proteómica, organismos

transgénicos, micropropagación, productos nutracéuticos, valorización de residuos, fitobiomas, control biológico, biodiversidad nativa y bioeconomía, entre otros temas.

El evento, además, fue un punto de encuentro entre la academia y el sector productivo, permitiendo, a través de la iniciativa "Science Match", el intercambio de experiencias y el establecimiento de alianzas estratégicas que impulsen el aprovechamiento de la biotecnología para mejorar la competitividad de las cadenas productivas. Esta iniciativa, que nació en el año 2018, tiene como propósito estimular, a la par de la difusión de investigación, el contacto directo entre quienes producen el conocimiento y quienes lo asimilan, con vistas a ir propiciando la tan necesaria y desconocida transferencia de la biotecnología agrícola al sector productivo pues como CIBE, somos portadores de soluciones para los desafíos del sector productivo. Este año las categorías de expertos para citas fueron Agricultura y agroindustria, Categoría Alimentos, Química y ambiente e Innovación tecnológica, lo que arrojó un total de 6 citas agendadas con acuerdos de seguimiento para un futuro relacionamiento. Aunado a ello, la realización de la II reunión de socios de la red CYTED-BIOALI, permitió establecer un enlace internacional no solo entre académicos sino también, de empresarios extranjeros y nacionales que apuestan por la incorporación cada vez mayor de la biotecnología, en el sector cacao y banano.



V CONGRESO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIODIVERSIDAD 2020
"LA BIOTECNOLOGÍA, ALIADA ESTRATÉGICA EN LA RECUPERACIÓN
AGROINDUSTRIAL POST COVID-19".

¹ Presidente Comité Organizador CIBB.



V Congreso Internacional de
Biología y Biodiversidad
CIBB 2020
MODALIDAD VIRTUAL

XVII INTERNATIONAL
BANANA
CONVENTION 2020
VIRTUAL

ALIANZA ESTRATÉGICA PARA SEGUIR AVANZANDO EN TIEMPO DE PANDEMIA

NUESTROS ALIADOS



Dra. Paloma Moncaleán
NEIKER BRTA - BIOALI CYTED

NEIKER MEMBER OF
BASQUE RESEARCH
& TECHNOLOGY ALLIANCE



Dra. Daynet Sosa
CIBE - ESPOL

espol Centro de
Biotecnología

bioali

PROGRAMA
IBEROAMERICANO
CYTED
CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA EL DESARROLLO

Adicionalmente, se realizó un curso post congreso: "Tecnologías y aplicaciones en el agregado de valor de la madera", en modalidad virtual, durante los días 13, 14 y 15 de octubre, sin ningún costo para los 29 participantes registrados, cuyo objetivo fue mostrar las nuevas tecnologías y enfoques disponibles para el mejoramiento de especies forestales y el agregado de valor de la madera.

Dentro del evento se presentaron 70 trabajos, en modalidad de audio cartel, (69 nacionales y 11 internacionales) divididos en tres áreas o sesiones: Avances científicos en Banano y Cacao, Biotecnología y Biodiversidad y Tecnología Limpias y Bioproductos. En cada una de ellas se mostraron avances de investigación y puntos de vista de los investigadores del CIBE y de representantes de 14 instituciones académicas del Ecuador y 7 internacionales, lo cual muestra el alcance de nuestro evento en el país y la región. En cada una de las sesiones se premió al mejor trabajo de investigación y además se contó con la presentación de algunos casos exitosos de relacionamiento empresa- investigación a nivel regional.

Si bien el tema central y compartido con el Foro internacional del banano fueron los avances en la mejora genética del cultivo y la importancia del debate nacional sobre un programa nacional de mejora genética, este espacio científico nos permitió también debatir sobre otros productos como el cacao, y

temas esenciales para el sector productivo como los procesos de fermentación para la obtención del chocolate. Abordamos también las problemáticas del arroz desde el punto de vista agrícola y comercial, y pusimos a disposición del público nuestros logros en materia de fertilizantes orgánicos.

Hemos de mencionar el apoyo que recibimos por parte de nuestro coorganizador y auspiciantes: AEBE, Red CYTED-BIOALI, programa CEDIA, a VLIR-NETWORK Ecuador y a Gustavo Venegas Representaciones así como de la ESPOL y su Gerencia de comunicaciones. Expresamente mencionar la difusión científica de este evento a través de las redes sociales, el libro de memorias así como la posibilidad de publicar en la revista BIONATURA los mejores trabajos científicos presentados en cada sesión.

Antes de finalizar quisiera agradecer y reconocer el arduo y valioso esfuerzo del Comité organizador y comité científico del CIBB, agradecer la participación de los 204 asistentes a la plataforma virtual, a cada uno de los ponentes, al equipo editorial de BIONATURA y a todos aquellos que hicieron posible la realización del Congreso, evento que en su quinta edición nos ha reafirmado la importancia de ir de la mano con el sector privado para encontrar soluciones a problemas y caminar juntos a la innovación que tanto necesita el país para su desarrollo productivo.



LETTER TO EDITOR / CARTA AL EDITOR

The role of science in our society

Julio A. Bonilla Jaime

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.2

Reaching society with the most relevant scientific advances achieved worldwide is an essential responsibility for academics and researchers. Unfortunately, frequently the knowledge generated in universities and research centers fails to reach the private sector and civil society, which are meant to be the final consumers of this knowledge. Today, more than ever, promoting alliances between academia, industry, and the government is critical to promote technological and creative solutions to urgent problems we face as a society.

Events like the V Biotechnology and Biodiversity International Congress ("CIBB" for its name in Spanish) offer an excellent platform for researchers in biotechnology and business leaders to share ideas, experiences, and expertise. Several relevant topics were discussed during the event, where top-level scientists shared their latest advancements, highlighting the strong connection between biotechnology and biodiversity. For instance, discussions on genetic editing technologies like CRISPR/CAS demonstrated the advantages of using such precise editing tools to tackle climate resilience and power-up agricultural traits in crops to attain food security and nutrition for future generations. Other revealing discussions brought attention to the importance of preserving our environment and its biodiversity. It was emphasized that there still exist many secrets hidden in the genetic of organisms and their interactions, which uncovering would be essential to make a green industrial revolution a reality.

Biotechnology is a promising strategy for the sustainable development of green industries, still rising in underdeveloped countries where the risk of biodiversity loss is a significant threat. Currently, the development of clean technologies focused on the design of high value-added biobased products – e.g., food additives, agricultural bio inputs, crops biofortification, and designed microorganisms – is proving to be fertile ground for the partnership between scientists and the private sector.

It must be noted that conveying pragmatic and timely scientific solutions to world problems should not be an enterprise of scientists alone. Scientists' efforts must be complemented with appropriate public policies to facilitate knowledge co-creation and adoption of scientific advancements into the private sector, thus forming long-lasting partnerships between science and the industry.

Although several challenges remain to be addressed, one thing is undeniable, the best approach to achieving the objectives of academia and the private sector is hand-in-hand collaboration. This will only be achieved by forging a strong alliance at the institutional, state, regional, and, why not, global level. I urge events like the V CIBB to continue to be replicated, and may this allow our society to get involved now more than ever in the decision-making and direction that research should take.

1451



¹Biotechnology Research Center (CIBE), Faculty of Life Sciences, Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Ecuador.

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Optimización en la aclimatación de plántulas micropropagadas de banano (*Musa sp.*) utilizando tres insumos orgánicos

Optimization in the acclimatization of banana micro propagated seedlings (*Musa sp.*) using three organic inputs

Andy Fabricio Mora-González^{1,2}, Jaime Alberto Naranjo-Morán¹, Alexander Albiño-Quitiaquez¹, José Alcides Flores-Cedeño^{1,2}, Rodrigo Oviedo-Anchundia¹, Luis Galarza-Romero¹, Marisol Vera-Oyague², Vicente Painii-Montero², Milton Senen Barcos-Arias¹

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.3

Resumen: El éxito de la micropropagación de plantas *in vitro* depende en parte de la fase de aclimatación, esta etapa presenta problemas de supervivencia y conlleva extensas semanas de adaptación. En este sentido, la utilización de microorganismos eficientes nativos son una alternativa biotecnológica para adaptar plantas *in vitro*. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la aplicación de *Trichoderma ghanense*, micorrizas arbusculares y un biofertilizante líquido en plantas meristemáticas de banano variedad William en las fases de aclimatación y vivero. Para los ensayos en las fases de aclimatación y vivero se realizaron 20 tratamientos y se utilizó un diseño factorial 2^(k) con una duración de seis semanas en ambas fases. Los resultados demuestran que en la fase de aclimatación el mejor tratamiento fue el B10 con incrementos del 29,6 % de altura y 19,9 % de diámetro respecto al control; mientras que, para el área foliar fue el B19 con 84,7 % de incremento en comparación al control. En fase de vivero el mejor tratamiento fue el B19 presentando incrementos del 14,5 % altura, 19,3 % diámetro del pseudotallo, 13,4 % área foliar, 91,8 % longitud radicular, 39,98 % peso húmedo y 90,5 % peso seco en comparación al control. Ambas fases alcanzaron porcentaje de micorrización mayores al 45 %. Los porcentajes de supervivencia fueron del 100 % en fase de aclimatación. Por lo expuesto, se concluye que los bioinsumos constituyen una alternativa para el manejo y adaptación de plantas producidas *in vitro*.

Palabras clave: Adaptación, bioproductos, micorrización, supervivencia.

Abstract: The successful micropropagation process of banana *in vitro* plants differs on the acclimatization stage, so there are survival problems at this stage, and it involves several weeks of adaptation. Therefore, the use of efficient microorganisms is a biotechnological alternative for the adaptation of *in vitro* plants. The present work aims to evaluate the effect of *Trichoderma ghanense*, arbuscular mycorrhizae, and a liquid biofertilizer in meristematic plants of banana variety William in the acclimatization and vivarium phases. Factorial design 2^(k) with 20 treatments were used under greenhouse conditions for six weeks in two phases. The best treatment on the acclimatization phase was B10 increasing the height by 29.6 % and the diameter by 19.9 %, while in the leaf area the best treatment was B19 with 84.7 % increase. Identically, into the nursery phase, the best treatment was B19, with increases of 14.5 % height, 19.3 % diameter of pseudostem, 13.4 % foliar area, 91.8 % root length, 39.98 % wet weight, and 90.5 % dry weight. Finally, in both phases, the mycorrhization percentage was more significant than 45 %. The survival percentages were 100 % during the acclimatization phase. Therefore, it is concluded that bioproducts constitute an alternative for the management and adaptation of plants produced by *in vitro* methodology.

Key words: Adaptation, bioproducts, mycorrhization, survival.

Introducción

La multiplicación meristemática de banano *in vitro* resuelve problemas fitosanitarios y constituye una herramienta en el mejoramiento genético para la obtención de plantas elites con desarrollo vigoroso^{1,2}, esta técnica comprende las etapas de establecimiento, multiplicación, enraizamiento, aclimatación y vivero¹. La eficiencia y calidad del proceso de las plantas meristemáticas dependen en parte de la fase de aclimatación y vivero; dado que, las condiciones ambientales son diferentes a las condiciones *in vitro*³, los explantes enraizados son sensibles a cambios agrometeorológicos provocando que las mismas no sobrevivan e incluso tardan extensas semanas para su adaptación⁴. Por tal motivo, en la fase de aclimatación es necesario temperaturas promedio de 25 ± 2 °C con 70 a 90 % de humedad relativa y baja luminosidad⁵.

En las fases de aclimatación y vivero de las plantas de

banano, estas dejan de usar medios ricos de sales y hormonas, por un sustrato que puede estar conformado por compost, arena, cascarilla de arroz, humus de lombriz o turba, con el fin de adaptar las plantas a condiciones ambientales⁶, sin embargo, el sustrato puede complementarse con insumos orgánicos que ayudan a mejorar la aclimatación de las plantas^{7,8}. Se ha demostrado que aplicar biol, hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y cepas de *Trichoderma spp.*, como insumos en el sustrato, ayudan al desarrollo radicular y aéreo de las plantas⁹.

La aplicación de HMA en plantas meristemáticas de banano (*Musa paradisiaca*) en fase de aclimatación ha permitido registrar mejoras cuantificables en crecimiento y grosor del pseudotallo de las plantas *in vitro*, incrementando el contenido de nitrógeno y fósforo en las hojas. Adicionalmente, la simbiosis entre raíces de las plantas y HMA producen un inter-

¹ Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias de la Vida, FCV, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, CIBE, Guayaquil, Ecuador.

² Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Guayas, Ecuador.

*Corresponding author: mbarcos@espol.edu.ec

cambio bidireccional de nutrientes¹⁰ y mejora la fertilidad del suelo creando una nutrición balanceada¹¹. Así mismo, inocular microorganismos del género *Trichoderma* y HMA en plantas obtenidas *in vitro* ha permitido que las plántulas se adapten mejor a las condiciones de invernadero¹².

Las cepas de hongos del género *Trichoderma* son consideradas como biocontroladoras de enfermedades, que ayudan a mejorar la producción y rentabilidad de diferentes cultivos; por su parte, las diferentes especies de *Trichoderma* poseen mecanismos de acción; tales como, micoparasitismo, antibiosis, competencia por los nutrientes, biofertilización y producción de compuestos volátiles¹³. Las *Trichodermas* a través del mecanismo de biofertilización solubiliza nutrientes del suelo y los proporciona a las plantas, esto lo logra a través de su rápido crecimiento hifal que penetra la epidermis de la raíz¹⁴.

Estudios por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (por sus siglas en inglés HPLC) de cepas de *Trichoderma ghanense*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma hamatum* inoculadas en plantas de *Cucumis melo*, demostró la producción de fitohormonas que influyen en la defensa de las plantas como ácido salicílico (AS) y ácido jasmónico (AJ) en las raíces y brotes¹⁵. Por otra parte, el biol conocido como un abono líquido orgánico obtenido por descomposición anaeróbica de microorganismos, es considerado como un biofertilizante para el fortalecimiento y nutrición de las plantas, que a su vez ayuda a reducir los problemas de estrés abiótico y permite la recuperación y reactivación de la vida del suelo^{16,17}. Con estos antecedentes, este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la aplicación de *Trichoderma ghanense*, micorrizas arbusculares y un biofertilizante líquido (biol) en plantas meristemáticas de banano variedad Williams en las fases de aclimatación y vivero, con el fin, de determinar cuál es la mejor combinación.

Materiales y métodos

Material vegetal y bioinsumos

Las plantas meristemáticas de banano variedad Williams utilizadas en este estudio disponían de una altura inicial de 2,5 cm provenientes del laboratorio de cultivo de tejidos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (CIBE-ESPOL).

La cepa *Trichoderma ghanense* y el consorcio de hongos micorrizicos arbusculares (HMA) (*Acaulospora sp.*, *Ambispora sp.*, *Diversispora sp.*, *Entrophospora sp.*, *Funneliformis sp.* y *Glomus sp.*) pertenecen al banco de microorganismos del CIBE.

Condiciones del experimento

El experimento constó de una primera fase de aclimatación (FA) y una segunda fase de vivero (FV), en ambas fases se empleó un sustrato que contenía arena y turba en proporción 2:1, las características fisicoquímicas del sustrato son: pH 6,8 (suelo: agua 1:2,5), 1,5 % de materia orgánica (Walkey Black), y en ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 13,0 de N, 21,0 de P, 0,5 de B (colorimetría), 56,0 de K, 1993,0 de Ca, 245,0 de Mg, 1,7 de Zn, 14,0 de Fe (absorción atómica), 41,0 de S (turbidimetría).

El sustrato se colocó en fundas de polietileno de color negro que contenían un volumen de 250 g para la FA; mientras que, en la FV las fundas contenían un volumen de 1750 g. Las plantas de banano crecieron a una temperatura de 28 ± 2 °C y 75 % de humedad relativa.

El riego en la FA se aplicó 5 mL/planta, tres días a la semana; mientras que, en la FV fue 50 mL/planta, tres días a la semana¹⁸. La aplicación de los insumos orgánicos se realizó en

las dosis recomendadas según las descripciones de los tratamientos planteados en el diseño experimental, la inoculación del consorcio de los HMA fue realizada una sola vez al momento del trasplante, aplicando entre 50 y 100 g de inóculo, con una concentración de 20 esporas/g de sustrato¹⁹. Con respecto a la inoculación de *T. ghanense* se realizó agregando una suspensión de esporas (10 mL/planta) a una concentración de 1×10^4 y 1×10^8 según el tratamiento, esto se aplicó al inicio en cada una de las fases y a los 15 días después del trasplante²⁰.

El biol fue aplicado al sustrato desde el inicio hasta la finalización de los experimentos en ambas fases con dosis de 5 mL/planta con intervalos de 15 días¹⁷. La fertilización convencional se realizó dos veces por semana aplicando un volumen de 5 mL/planta en la FA y 10 mL/planta en la FV según los tratamientos. La fertilización convencional contenía en (g/L): 0,9 de NH_4NO_3 , 1,04 de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y 0,85 de KCl.

Se empleó un diseño experimental factorial $2^{(4)}$ para la FA y FV considerando como factores en estudios: micorrizas arbusculares, *Trichoderma ghanense*, biol y la fertilización convencional, como se describen en la tabla 1.

Parámetros agronómicos y fisiológicos

En la FA se evaluaron parámetros de altura, diámetro del pseudotallo, área foliar y porcentaje de micorrización; mientras que, en la FV además de los parámetros antes mencionados se evaluaron contenido de clorofila, contenido de N-P-K en hojas, longitud radicular, peso seco, húmedo y reaislamiento de *T. ghanense* del sustrato al finalizar el experimento.

La altura se realizó con una regla milimetrada midiendo desde la base del pseudotallo hasta donde se bifurcan las dos últimas hojas. El diámetro del pseudotallo se midió en la base, utilizando un calibre o pie de rey, marca electrónica digital calipera. Para el área foliar se utilizó un escáner marca Edson L395, se cortaron y escanearon las tres últimas hojas más joven (no incluye la hoja cigarro), en formato imagen JPG para a través del software de procesamiento y análisis de imágenes ImageJ®, determinar el área foliar por cada tratamiento en estudio²¹.

Para cuantificar el contenido de clorofila, se realizaron lecturas a la sexta semana en la tercera hoja más joven de las plantas de banano, utilizando un medidor electrónico marca Minolta SPAD 502, que determina a la clorofila en unidades SPAD.

Para determinar el peso húmedo y seco de las plantas de banano se pesaron en una balanza analítica (marca entrís, modelo ENTRIS224i-1S de calibración interna), el peso seco se obtuvo después de secar las plantas en una estufa a 80 °C hasta obtener el peso constante²².

Para cuantificar el contenido de N-P-K, se cortó la tercera hoja de los diferentes tratamientos. Las muestras fueron enviadas al laboratorio del INIAP Litoral del Sur "Dr. Enrique Ampuero Pareja"²³, donde las muestras fueron pulverizadas mediante un molino eléctrico, luego fueron ingresadas a un digestor de microondas a temperatura de 200 °C por 1 h (Milestone, VAC-1000 ACID SCRUBBER MODULE), transcurrido este tiempo el digerido se analizó en un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer, Analyst 400).

Porcentaje de micorrización

Se empleó el procedimiento de tinción de raíces propuesto por Phillips y Hamman²⁴. Se tomaron raíces de las plantas de banano y se lavaron con agua, fueron sumergidas en KOH al 10 % y autoclavadas por 10 min a 121 °C (15 lb de presión). Se retiró el KOH para reemplazarlo por HCl al 1 % dejando en reposo por 3 min, posteriormente se retiró el HCl y se agregó azul de tripano al 0,05 % en lactoglicerol y se autoclavó según las condiciones

Nº.T	Combinación de los insumos
B1	Biol 2 % + <i>T. ghanense</i> 1x10 ⁴ + Micorriza 50 g + Fert. convencional ½
B2	Biol 4 % + <i>T. ghanense</i> 1x10 ⁴ + Micorriza 50 g + Fert. convencional ½
B3	Biol 2 % + <i>T. ghanense</i> 1x10 ⁸ + Micorriza 50 g + Fert. convencional ½
B4	Biol 4 % + <i>T. ghanense</i> 1x10 ⁸ + Micorriza 50 g + Fert. convencional ½
B5	Biol 2 % + <i>T. ghanense</i> 1x10 ⁴ + Micorriza 100 g + Fert. convencional ½
B6	Biol 4 % + <i>T. ghanense</i> 1x10 ⁴ + Micorriza 100 g + Fert. convencional ½
B7	Biol 2 % + <i>T. ghanense</i> 1x10 ⁸ + Micorriza 100 g + Fert. convencional ½
B8	Biol 4 % + <i>T. ghanense</i> 1x10 ⁸ + Micorriza 100 g + Fert. convencional ½
B9	Biol 2 % + <i>T. ghanense</i> 1x10 ⁴ + Micorriza 50 g + Fert. convencional
B10	Biol 4 % + <i>T. ghanense</i> 1x10 ⁴ + Micorriza 50 g + Fert. convencional
B11	Biol 2 % + <i>T. ghanense</i> 1x10 ⁸ + Micorriza 50 g + Fert. convencional
B12	Biol 4 % + <i>T. ghanense</i> 1x10 ⁸ + Micorriza 50 g + Fert. convencional
B13	Biol 2 % + <i>T. ghanense</i> 1x10 ⁴ + Micorriza 100 g + Fert. convencional
B14	Biol 4 % + <i>T. ghanense</i> 1x10 ⁴ + Micorriza 100 g + Fert. convencional

Tabla 1. Descripción de las combinaciones del diseño experimental 2⁽⁴⁾.

antes mencionadas. Las raíces fueron colocadas en portaobjetos para determinar el porcentaje de micorrización (% MIC) a través de la fórmula propuesta por McGonigle *et al.*²⁵.

Reaislamiento de *Trichoderma ghanense*

Se tomó 1 g del sustrato de los tratamientos que fueron inoculados con *T. ghanense* y se depositó en un tubo falcón de 14 mL que contenía 10 mL de agua destilada esterilizada. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻³, luego se tomó 100 µL para ser sembrado en una caja petri con medio PDA e incubada a 30 ± 1 °C por 96 horas²⁶. Al crecer el hongo se realizó una resiembra en medio PDA; no obstante, para comprobar la presencia del *T. ghanense* se empleó la técnica de montaje con porta y cubre objeto adicionando azul de metileno al 1 % para la tinción del hongo French & Hebert²⁷. Las estructuras morfológicas fueron comparadas con los reportes de Barrera²⁸.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con estadística descriptiva, análisis de varianza (ANOVA) y comparación de contraste de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), previo de considerar la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0.05$) mediante el uso del Software estadístico InfoStat versión estudiantil 2017.

Resultados y discusión

Adaptación de las plántulas de banano

Los tratamientos que fueron inoculados con *T. ghanense*, consorcio de micorrizas y biol presentaron un 100 % de supervivencia a la sexta semana en la fase de aclimatación en comparación al control que presentó un 84 % (tabla 2). Aplicando estos bioinsumos se mejoró el porcentaje de supervivencia de las plantas *in vitro*⁶, lo cual puede deberse a que las micorrizas; estimulan en las plantas la síntesis de proteínas implicadas en la tolerancia al estrés biótico y abiótico²⁹, es decir, las raíces micorrizadas mantienen la integridad celular y limitan la necesidad de expansión de las células de la raíz, mejorando la absorción hídrica del suelo y aumentando el contenido de agua en la biomasa aérea, permitiendo optimizar el desarrollo de la planta³⁰.

Ortas *et al.*⁹ aplicando de manera independiente especies de *Glomus caledonium* y *Glomus macrocarpum* alcanzaron 40,0 y 66,7 % de supervivencia en la fase de aclimatación en plantas de banano variedad Dwarf. Pérez *et al.*³¹ aclimatando plantas *in vitro* de *Rubus glaucus* utilizaron *Glomus sp.*, *Pseudomonas migulae* y *Bacillus amyloliquefaciens*, lograron una mejor adaptación, desarrollo y vigor de las plántulas con una supervivencia del 80 %. Por otro lado, *T. ghanense* induce a las plantas a producir AS y

$$\% \text{ MIC} = \frac{\text{Número de campos infectados \{Hifas, Vesículas, Arbúsculos\}}}{\text{Total de campos observados}} \times 100$$

Fórmula. Fórmula propuesta por McGonigle *et al.*²⁵.

AJ que influyen en la defensa contra el estrés abiótico, llegando a mejorar la adaptación en ambientes adversos^{15,32}.

Variables agronómicas de la fase de aclimatación (FA)

A la sexta semana los tratamientos B10 y B8 para la altura y diámetro del pseudotallo presentaron los mejores valores con diferencias estadísticas significativas en comparación al control (tabla 2), los dos tratamientos son superiores en altura y similares en diámetro a los reportados por Montejó *et al.*³³, quienes alcanzaron 8,0 cm de altura y 6,80 mm de diámetro a los 30 días en plantas de banano variedad FHIA-03 al crecer en un sustrato compuesto de bioinsumos sólidos a base de 50 % humus de lombriz y 50 % compost más la adición de un bioinsumo líquido de humus de lombriz fortificado con

fitohormonas (auxinas, giberelinas), por otra parte, Acosta y Galindo³⁴ observaron que sumergir las raíces en brasinoesteroides en una dosis de 0,01 mg/L en plantas *in vitro* de banano variedad FHIA-18, previo al trasplante en la fase de aclimatación obtuvieron 4,5 cm de altura y 6,6 mm de diámetro a los 45 días, siendo estos valores inferiores en altura y similares en diámetro a lo reportado en los tratamientos B10 y B8.

La aplicación combinada de *T. ghanense* y el consorcio de micorrizas favorecieron el crecimiento en altura y diámetro del tallo de las plantas de banano en fase de aclimatación, lo que puede deberse a que estos microorganismos tienen la capacidad de producir diferentes compuestos químicos como el ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (AIB), además de la solubilización del fósforo presente en el sustrato²⁹. Robinson y

Tratamientos	Supervivencia (%)	Variables agronómicas	
		Altura (cm)	Diámetro del pseudotallo (mm)
B1	100	7,88 ±0,2 ^A	5,75 ±0,2 ^A
B2	100	6,63 ±0,1 ^A	5,58 ±0,2 ^A
B3	100	7,92 ±0,3 ^B	6,08 ±0,2 ^A
B4	100	8,17 ±0,2 ^B	5,83 ±0,2 ^A
B5	100	7,92 ±0,3 ^B	5,67 ±0,2 ^A
B6	100	8,38 ±0,3 ^B	5,83 ±0,2 ^A
B7	100	8,58 ±0,4 ^B	6,25 ±0,2 ^A
B8	100	9,63 ±0,3 ^F	6,33 ±0,2 ^A
B9	96	9,25 ±0,3 ^D	6,00 ±0,2 ^A
B10	100	9,50 ±0,3 ^E	6,50 ±0,2 ^B
B11	100	9,21 ±0,3 ^D	6,75 ±0,3 ^C
B12	100	9,29 ±0,2 ^D	6,33 ±0,2 ^A
B13	100	8,09 ±0,2 ^B	5,67 ±0,2 ^A
B14	100	7,79 ±0,2 ^A	5,83 ±0,2 ^A
B15	100	8,63 ±0,2 ^C	5,92 ±0,2 ^A
B16	100	8,29 ±0,2 ^B	5,92 ±0,2 ^A
B17	100	8,25 ±0,3 ^B	5,92 ±0,2 ^A
*B18	84	7,33 ±0,2 ^A	5,42 ±0,2 ^A
B19	100	8,21 ±0,1 ^B	6,25 ±0,2 ^A
B20	100	8,66 ±0,3 ^C	5,66 ±0,3 ^A

***Control con dosis alta de fertilización; n: 25; ± error experimental; letras distintas en la hilera indican diferencias significativas según test de Tukey ($p<0,05$).**

Tabla 2. Resultados de los parámetros agronómicos evaluados a la sexta semana de la fase de aclimatación.

Galán³, mencionan que una planta aclimatada de banano debe presentar una altura promedio de 7 cm y 6 mm de diámetro del pseudotallo para pasar a fase de vivero.

En la variable área foliar, evaluada a la sexta semana en la fase de aclimatación no se encontró diferencia estadística significativa entre los tratamientos en comparación al control, al aplicar el test estadístico de Tukey ($p < 0,05$), no obstante, los tratamientos que contenían los bioinsumos presentaron promedios mayores al control, siendo el mejor tratamiento B19 alcanzando $38,14 \pm 2,1 \text{ cm}^2$ en comparación al control que alcanzó $20,65 \pm 4,1 \text{ cm}^2$ (Figura 1A). El resultado obtenido en el B19 fue superior al reportado por Acosta y Galindo³⁴, quienes obtuvieron un área foliar de $25,93 \text{ cm}^2$ al aclimatar plantas *in vitro* de banano FHIA-18, aplicando brasinoesteroide al momento del trasplante; lo que demuestra que la inoculación de HMA en el tratamiento B19 mejoró el desarrollo foliar de las plantas. Folli-Pereira *et al.*²⁹, afirman que las diferentes respuestas morfológicas manifestadas en plantas micorrizadas involucran un superior desarrollo, seguido de cambios fisiológicos y bioquímicos, resultando en el aumento de las estructuras aéreas de las plantas, en este contexto, Estrada-Luna y Davis³⁵ mencionan que una rápida colonización de HMA en las raíces mejora la fisiología de las plantas, incluso ayudan a recuperarse rápido durante la aclimatación y a generar un mayor crecimiento durante la post-aclimatación.

Variables agronómicas de la fase de vivero (FV)

Los mejores resultados en altura y diámetro del pseudotallo en la FV se obtuvieron en el tratamiento B19 en comparación al control (tabla 3). El crecimiento en el B19 es favorecido por la presencia de los HMA ya que estos permiten la asimilación y solubilización de los minerales presentes en el

sustrato^{36,37}. Efectos similares han sido obtenidos por Koffi y Declerck⁶, quienes inoculando HMA en plantas *in vitro* de banano en condiciones controladas lograron a la quinta semana una altura de 15,02 cm y 17,8 mm de diámetro; mientras que, Barrera-Violeth *et al.*³⁸, inocularon *Glomus sp.*, *Acaulospora sp.* y *Scutellospora sp.* en plantas de plátano, variedad Hartón en fase de vivero, obtuvieron crecimientos significativos de 50 cm de altura y 32,3 mm de diámetro a los 90 días.

El tratamiento B15 y B19 consiguieron un área foliar de $181,45 \pm 9,3 \text{ cm}^2$ y $171,50 \pm 9,6 \text{ cm}^2$ respectivamente, presentado estos dos tratamientos diferencia estadística significativa en comparación al control que alcanzó $151,24 \pm 7,8 \text{ cm}^2$ (Figura 1B), respecto al contenido de clorofila el mejor tratamiento fue el B17 obteniendo $47,4 \pm 0,7$ unidad SPAD en comparación al control que obtuvo $46,6 \pm 0,7$. Pérez *et al.*³¹, aplicando una combinación de micorriza del género *Glomus sp.* y una Rhizobacteria (*Pseudomonas migulae*) en plantas *in vitro* de *Rubus glaucus L.*, a los 80 días aumentó el área foliar a $73,87 \text{ cm}^2$ respecto al control que consiguió $52,41 \text{ cm}^2$, en este contexto, Estrada-Luna y Davis³⁵, inocularon con HMA plantas micropropagadas de pimiento (*Capsicum annum*) y observaron un mayor aumento del área foliar y contenido de clorofila a diferencia de las plantas que no contenían micorrizas.

El aumento del área foliar y contenido de clorofila de los tratamientos inoculados con HMA, *T. ghanense* y biol ejercieron efectos al aplicarlos directamente al sustrato, lugar donde crecen las raíces de las plantas³⁹, es así, que la aplicación de un consorcio de HMA estimulan el desarrollo foliar, permitiendo una mayor actividad fotosintética o producción de fotoasimilados y contenido de clorofila^{40,41}, mientras que, la aplicación del biofertilizante líquido (biol) aporta al sustrato con nitrógeno y fósforo asimilable para las plantas³⁹.

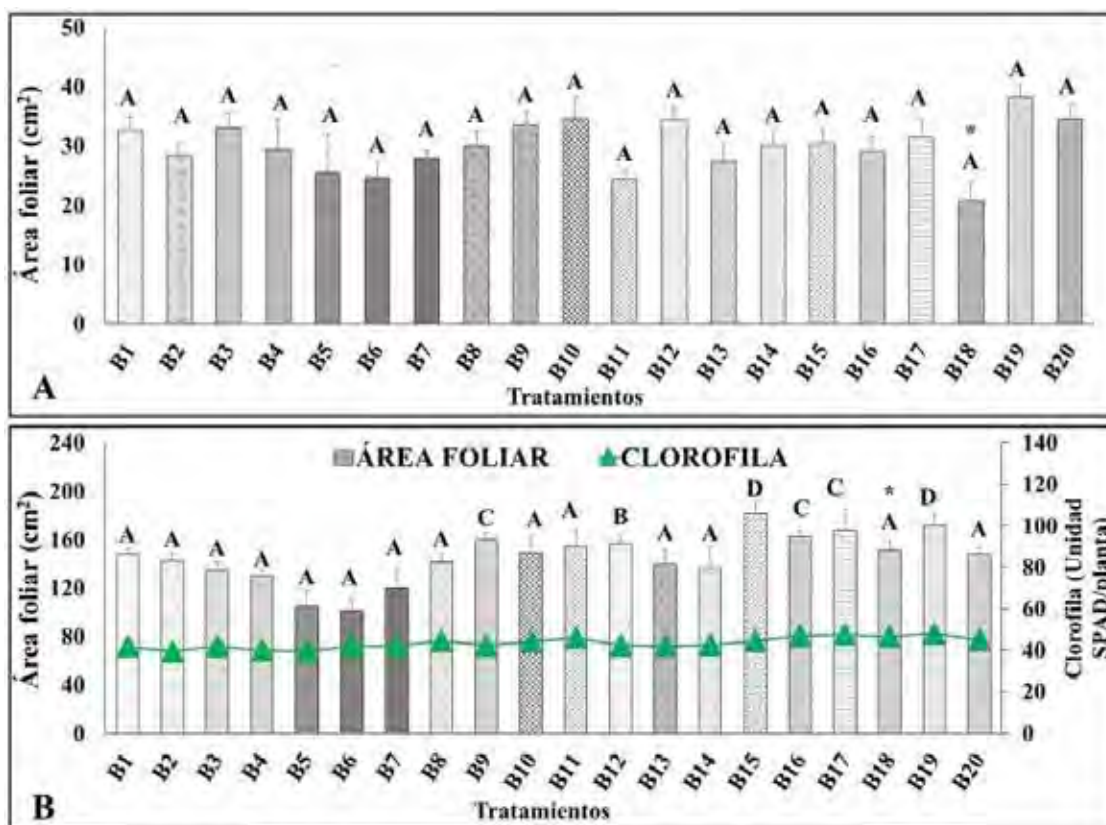


Figura 1. Comportamiento del área foliar. A: Área foliar evaluado a la sexta semana fase de aclimatación. B: Área foliar y contenido de clorofila evaluado a la sexta en fase de vivero. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas según test de Tukey ($p < 0,05$); \pm error experimental; * control.

Tratamientos	Variables agronómicas	
	Altura (cm)	Diámetro del pseudotallo (mm)
B1	20,38 ± 0,5 ^A	15,75 ± 0,3 ^C
B2	21,96 ± 0,7 ^B	15,50 ± 0,2 ^B
B3	20,21 ± 0,6 ^A	15,25 ± 0,1 ^A
B4	19,67 ± 0,5 ^A	15,17 ± 0,3 ^A
B5	18,29 ± 0,9 ^A	14,17 ± 0,4 ^A
B6	19,04 ± 0,7 ^A	14,42 ± 0,4 ^A
B7	20,08 ± 0,6 ^A	14,50 ± 0,3 ^A
B8	20,67 ± 0,4 ^A	14,00 ± 0,1 ^A
B9	20,46 ± 0,9 ^A	15,17 ± 0,3 ^A
B10	22,46 ± 0,7 ^C	15,75 ± 0,5 ^C
B11	22,29 ± 0,6 ^C	15,17 ± 0,3 ^A
B12	21,92 ± 0,5 ^B	15,08 ± 0,2 ^A
B13	19,71 ± 0,7 ^A	14,50 ± 0,3 ^A
B14	19,88 ± 0,6 ^A	14,08 ± 0,3 ^A
B15	21,58 ± 0,6 ^B	15,42 ± 0,2 ^A
B16	21,96 ± 0,4 ^B	15,17 ± 0,3 ^A
B17	21,21 ± 0,9 ^A	14,75 ± 0,4 ^A
*B18	20,63 ± 0,7 ^A	14,25 ± 0,3 ^A
B19	23,63 ± 0,4 ^D	17,00 ± 0,3 ^E
B20	19,96 ± 0,8 ^A	16,08 ± 0,3 ^D

***Control fertilización convencional; n: 12; ± error experimental; letras distintas en la hilera indican diferencias significativas según test de Tukey (p<0,05).**

Tabla 3. Variables de crecimientos evaluadas a la sexta semana de la fase de vivero.

Análisis foliar, biomasa húmeda y seca

Los resultados del análisis foliar de las plantas meristemática de FV arrojaron que el tratamiento que presentó mayor contenido de potasio (K) en sus hojas fue el tratamiento B12 en comparación al control; los valores obtenidos en el B12 están en el rango óptimo según lo reportado por López y Espinoza⁴² ver (tabla 4).

El alto contenido de P y K presente en las plantas, indican que estos elementos fueron asimilados gracias a que sus raíces están inoculadas con HMA y la cepa *T. ghanense*; hongos que permiten la solubilización de los fosfatos del sustrato, micronutrientes y cationes minerales, como hierro, manganeso y magnesio, permitiendo que las plantas los absorban mejor^{43,41}. En el trabajo reportado por Ortas *et al.*⁹, observaron que al inocular micorrizas del género *Glomus caledonium* se encontró en las hojas de plátano variedad Dwarf Cavendish una mayor absorción de 2,1 g/kg de fósforo; mientras que, al aplicar *Glomus macrocarpum* obtuvieron 1,3 g/kg, siendo superior al control 0,6 g/kg. Así mismo, Rui-Xia *et al.*³², observaron que al inocular *T. harzianum* surge un efecto directo en el desarrollo de la raíz, lo

que repercute directamente en la absorción de los nutrientes.

La mayor cantidad de biomasa húmeda y seca en FV se presentó en los tratamientos B20 y B19, encontrando diferencias estadísticas significativas en comparación al control (tabla 4).

La respuesta observada en la producción de biomasa en el B20 podría deberse a la presencia de *T. ghanense*; mientras que, en el B19 a la inoculación de los HMA. Neyra *et al.*²² aplicando 5 mL de una suspensión 1x10⁸ esporas/mL de *Trichoderma viride* estimuló el desarrollo de plántulas de *Capsicum annum* L. var. Longum generando una mayor cantidad de biomasa en condiciones de laboratorio, así mismo, Kamaruzzaman *et al.*⁴⁴, al aplicar *T. harzianum* evidenció una estimulación en el crecimiento y producción de biomasa en las plantas de *Arachis hypogaea*. Las cepas de microorganismos usadas en este trabajo aportaron a la asimilación de los nutrientes y estimularon el desarrollo de las plantas de banano⁴¹.

Longitud radicular y porcentaje de micorrización

La mejor longitud radicular se encontró en el tratamiento B19, presentando diferencia estadística significativa en com-

Tratamientos	Contenido nutricional en %			Biomasa	
	N (2,6 - 3,5) ^a	P (0,18 - 0,29) ^a	K (3,0 - 4,5) ^a	Peso húmedo (g)	Peso Seco (g)
B1	1,80	0,16	4,20	73,50±4,6 ^B	6,16±0,4 ^B
B2	2,40	0,18	4,18	69,73±4,1 ^A	5,26±0,5 ^A
B3	2,10	0,23	4,98	61,70±2,6 ^A	4,64±0,4 ^A
B4	2,20	0,21	4,13	59,30±4,6 ^A	4,34±0,5 ^A
B5	2,40	0,27	5,82	50,27±4,1 ^A	3,65±0,4 ^A
B6	2,40	0,28	6,12	57,30±1,1 ^A	4,44±0,1 ^A
B7	2,40	0,32	6,72	53,37±3,0 ^A	3,70±0,3 ^A
B8	2,50	0,27	6,00	55,77±3,1 ^A	4,06±0,3 ^A
B9	2,90	0,28	6,06	52,07±7,1 ^A	3,88±0,7 ^A
B10	2,90	0,28	6,06	56,80±6,1 ^A	3,86±0,5 ^A
B11	2,80	0,26	5,70	57,73±3,2 ^A	3,90±0,4 ^A
B12	2,90	0,31	6,60	59,97±3,2 ^A	4,09±0,3 ^A
B13	2,80	0,29	6,30	55,43±4,2 ^A	3,83±0,4 ^A
B14	2,70	0,28	6,12	57,83±3,1 ^A	4,06±0,5 ^A
B15	2,90	0,29	5,52	64,90±2,6 ^A	4,39±0,2 ^A
B16	2,80	0,24	4,16	61,70±2,6 ^A	3,84±0,3 ^A
B17	2,90	0,33	5,58	65,40±2,7 ^A	4,81±0,4 ^A
*B18	2,70	0,28	3,88	64,03±3,1 ^A	4,09±0,7 ^A
B19	2,80	0,28	3,90	89,63±4,4 ^C	7,79±0,7 ^C
B20	1,90	0,21	3,19	93,33±3,4 ^D	7,95±0,4 ^C

Tabla 4. Resultados del análisis foliar de las plantas meristemática de banano y biomasa húmeda y seca evaluada a la sexta semana de la fase de vivero.

*Control fertilización convencional; ^aRangos óptimos del análisis foliar según lo establecido por López y Espinoza (1995); nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K); ± error experimental; letras distintas en la hilera indican diferencias significativas según test de Tukey ($p < 0,05$).

paración al control (Figura 2A). El crecimiento radicular desarrollado en el tratamiento B19 podría deberse a la inoculación del consorcio de HMA nativos, donde se encontró un alto porcentaje de micorrización (Figura 2B).

En la FA los tratamientos inoculados con el consorcio de HMA presentaron valores entre 40 y 70 % de micorrización; mientras que, en la FV se obtuvo del 55 y 90 % siendo superiores a los de la FA; En ambas fases el tratamiento B19 fue el que presentó mayor porcentaje de micorrización (Figura 2B) y (Figura 3 C-D). Koffi y Declerck⁶ inoculando HMA en plantas *in vitro* de banano bajo condiciones controladas, adquirieron porcentaje de micorrización de 40 y 64,7 % a la séptima semana, utilizando un sustrato compuesto de turba y arena en fase de aclimatación. Por su parte, Ortas *et al.*⁹, aplicaron de manera independiente especies de *Glomus caledonium* y *Glomus macrocarpum*, consiguiendo 50,8 y 68,8 % de micorrización en la

fase de aclimatación en plantas de banano variedad Dwarf.

Los resultados obtenidos en la FV son superiores a los reportados por Navnita *et al.*⁴⁵, quienes consiguieron porcentaje de micorrización entre 30,8 y 82,0 % a los 120 días utilizando interacciones de HMA como *Glomus mosseae* y *Acaulospora laevis* y una cepa de *Trichoderma sp.*, en este contexto Barrera-Violeth *et al.*³⁸, en plantas de plátano Hartón inoculando géneros de micorriza *Glomus sp.*, *Acaulospora sp.*, y *Scutellospora sp.*, en fase de vivero obtuvieron porcentaje de micorrización de 91,1 %. Por lo tanto, se comprueba que trabajar con un consorcio de micorrizas garantiza una mayor infección de los HMA en plantas de banano.

Al finalizar el experimento en la fase de vivero, se comprobó la presencia de *T. ghanense* a través de la caracterización morfológica de Barrera²⁸, en los tratamientos que fueron inoculados figura 3 A-B.

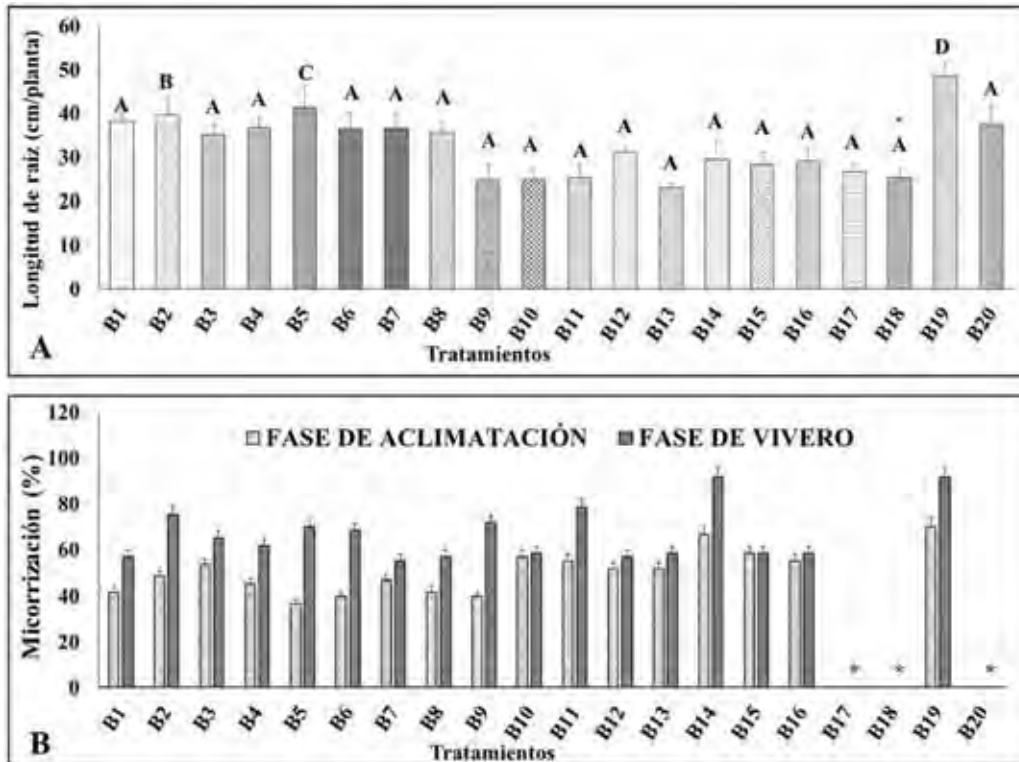
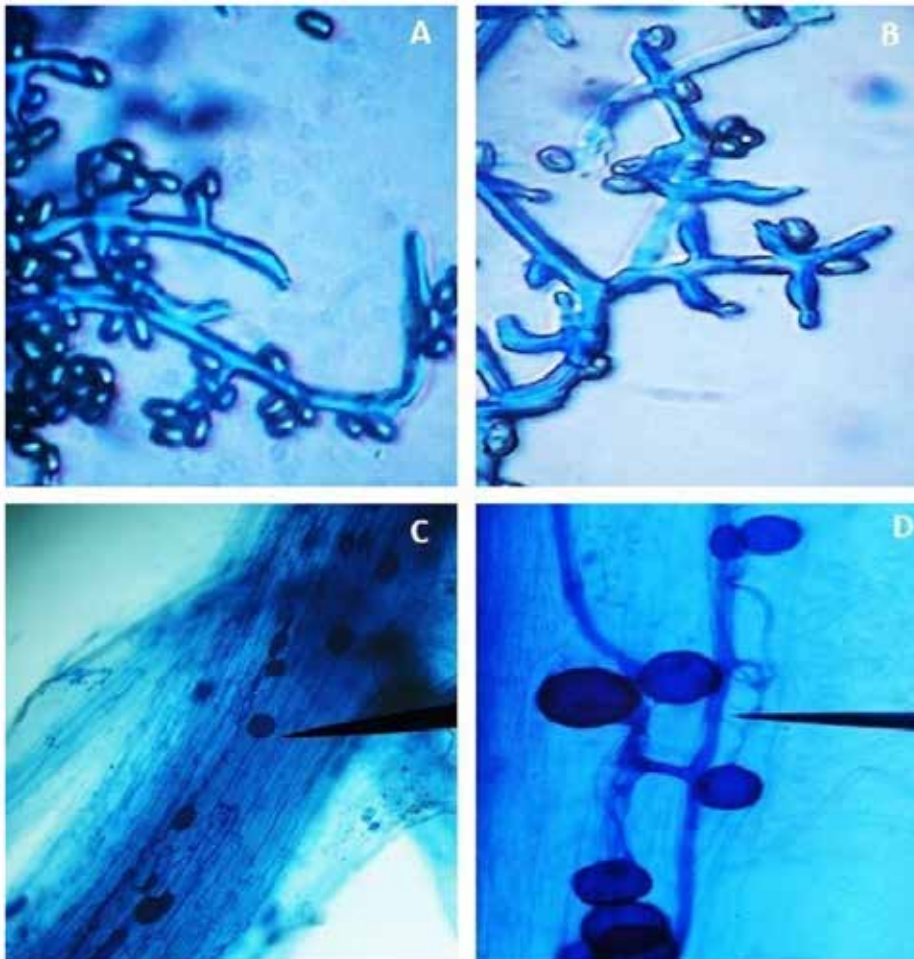


Figura 2. Longitud radicular y porcentaje de micorrización. A: Valores promedio de la longitud radicular de los tratamientos en fase de vivero; letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas según test de Tukey ($p < 0,05$); \pm error experimental; * control. B: Porcentaje de micorrización de las fases de aclimatación y vivero evaluada a la sexta semana después de la inoculación; * tratamientos sin la inoculación de HMA.



Conclusiones

La aplicación de bioinsumos mejoran los parámetros morfológicos, fisiológicos y de nutrición en las plantas meristemática de banano en la fase de aclimatación y vivero al promover la asimilación de los nutrientes presentes en el sustrato, lo que se traduce en un menor nivel de estrés al trasplante, periodos cortos de las fases de aclimatación y vivero, y una tasa de mortalidad de 0%. A través del análisis foliar se comprobó que los tratamientos inoculados con el consorcio de micorrizas, *T. ghanense* y el biol lograron alcanzar rangos óptimos de nutrición en nitrógeno, fósforo y potasio en la fase de vivero. Así las plantas de B19 (Fertilización convencional + Micorriza 100 g) a la sexta semana en la fase de vivero, alcanzaron los parámetros óptimos de altura y diámetro (tabla 3), para ser trasplantadas a campo, lo que reduce a la mitad los tiempos de entrega a los productores bananeros.

T. ghanense y el consorcio de los hongos formadores de micorrizas demostraron estimular el crecimiento de las plantas de banano en fase de aclimatación y vivero, esto se podría deber a la producción de fitasa, enzima que tiene la capacidad de liberar fósforo asimilable para las plantas, o mediante la producción de fitohormonas generada por ambos microorganismos.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

Referencias bibliográficas

- Silué, O., Kouassi, K., Koffi, K., Kouakou, K., Aké, S. Effect of adenine sulphate, casein hydrolysate and spermidine on in vitro shoot multiplication of two banana varieties (FHIA-21 and PITA-3). *Afr J Biotechnol.* 2017. 16(46), 2152-2159. doi: 10.5897/AJB2017.16247
- Datta, S., Jankowicz-Cieslak, J., Nielen, S., Ingelbrecht, I., Till, B.J. Induction and recovery of copy number variation in banana through gamma irradiation and low coverage whole genome sequencing. *Plant Biotechnol J.* 2018. 16(9), 1-10. doi: 10.1111/pbi.12901
- Robinson, J. C., Galán, V. Weaning (acclimatization) of in vitro produced banana plants. *Fruits.* 2009. 64(5), 325-332. doi: 10.1051/fruits:2009026
- Jofre, A. E., Vázquez, M. N., Hernández, A. R., Dávalos, P. A. Production and acclimatization of in vitro produced strawberry plants. In *Acta Horticulturae.* 2006. 727(5), 67-72. doi:10.17660/ActaHortic.2006.727.5
- Gago, J., Martínez-Núñez, L., Landín, M., Flexas, J., Gallego, P. Modeling the effects of light and sucrose on in vitro propagated plants: A multiscale system analysis using artificial intelligence technology. *Plos One.* 2014. 9(1), 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0085989
- Koffi, M. C., Declerck, S. In vitro mycorrhization of banana (*Musa acuminata*) plantlets improves their growth during acclimatization. *In vitro Cell Dev Biol-Plant.* 2015. 51(3), 265-273. doi: 10.1007/s11627-015-9666-0
- Pinker, I., Vuksani, G., Dietz, R., Böhme, M. Effects of different substrates on acclimatization of *Echinodorus* in vitro plants in greenhouse conditions. *Prop Orn Plants.* 2007. 7 (4), 195-198. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/261860725_Effects_of_different_substrates_on_acclimatization_of_Echinodorus_in_vitro_plants_in_greenhouse_conditions
- Zhang, J., Wang, Y., Wang, P., Zhang, Q., Yan, C., Yu, F. Effect of different levels of nitrogen, phosphorus, and potassium on root activity and chlorophyll content in leaves of *Brassica oleracea* seedlings grown in vegetable nursery substrate. *Hortic Environ Biotechnol.* 2017. 58(1), 5-11. doi: 10.1007/s13580-017-0177-2
- Ortas, I., Rafique, M., Akpınar, C., Aka, Y. Growth media and mycorrhizal species effect on acclimatization and nutrient uptake of banana plantlets. *Sci Hortic.* 2017. 217(15), 55-60. doi: 10.1016/j.scienta.2017.01.025
- Smith, S., Read, D. *Mycorrhizal symbiosis.* Third edition. Great Britain. Editorial Book AID international. 2008. 11-13. Retrieved from <https://www.elsevier.com/books/mycorrhizal-symbiosis/smith/978-0-12-370526-6>
- Johnson, N. C., Gehring, C., Jansa, J. *Mycorrhizas: At the Interface of Biological, Soil, and Earth Sciences.* In *Mycorrhizal Mediation of Soil: Fertility, Structure, and Carbon Storage.* Elsevier Inc. 2016. 1-6. doi: 10.1016/B978-0-12-804312-7.00001-2
- Kavoo-Mwangi, A. M., Kahang, E. M., Ateka, E., Onguso, J., Jefwa, J. M. Integration of commercial microbiological products into soil fertility practices as a potential option for acclimatization and growth of TC banana in Kenya. *OJSS.* 2014. 4(8), 259-271. doi: 10.4236/ojss.2014.48028
- Benítez, T., Rincón, A., Limón, M., Codón, A. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol.* 2004. (4), 249-260. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/8065870_Biocontrol_mechanism_of_Trichoderma_strains
- Druzhinina, I. S., Chenthamara, K., Zhang, J., Atanasova, L., Yang, D., Miao, Y., Rahimi, M. J., Grujic, M., Cai, F., Pourmehdi, S., Salim, K. A., Pretzer, C., Kopchinskiy, A. G., Henrissat, B., Kuo, A., Hundley, H., Wang, M., Aerts, A., Salamov, A., Lipzen, A., LaButti, K., Barry, K., Grigoriev, I. V., Shen, Q., Kubicek, C. P. Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts. *PLoS Genet.* 2018. 14(4), e1007322. doi: 10.1371/journal.pgen.1007322
- Martínez-Medina, A., Alguacil, M. D., Pascual, J. A., Van, S. C. Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. *J Chem Ecol.* 2014. 40(7), 804-815. doi:10.1007/s10886-014-0478-1
- Hualpa, R., Céspedes, R., Esprella, B. Evaluación del efecto de biol bovino en la producción y calidad de la avena forrajera (*Avena sativa* L.), en época de invierno en la estación experimental Choquenaira, Viacha – La Paz, RIIARn. 2016. 3(3), 103-113. Retrieved from http://www.scielo.org.bo/pdf/riiar/v3n1/v3n1_a12.pdf
- Pomboza-Tamaquiza, P., León-Gordón, O. A., Villacís-Aldaz, L. A., Vega, J., Aldáz-Jarrín, J. C. The influence of biol in the crop yield of *Lactuca sativa* L. variety Iceberg. *J Selva Andina Biosph.* 2016. 4(2), 84-92. Retrieved from <https://www.ingentaconnect.com/content/doaj/23083867/2016/0000004/0000002/art00005>
- Wong, K. F., Suhaimi, O., Fatimah, K. On-farm grower-friendly nursery technique for acclimatization of tissue-cultured banana seedlings. *AJPS.* (2017). 3(2), 146-151. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/3804/285b609c520c71d09798168164158060a5a7.pdf>
- Sosa, T., Sánchez, J., Morales, E., Cruz, F. Arbuscular mycorrhizae-*Trichoderma harzianum* (Moniliaceae) interaction and effects on *Brachiaria decumbens* (Poaceae)'s Growth. *Acta Biol Colomb.* 2006. 11(1), 43-54. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2006000100004
- Vera, J. L., Leon, B. Effect of the methods and application rates of *Trichoderma viride* on acclimatization and growth of vitroplants of potato variety black Imilla during periods of winter and spring. *Rev Investig Altoandín.* 2016. 18(1), 47-54. doi: 10.18271/ria.2016.177
- Padrón, R.A., Lopes, S. J., Swarowsky, A., Cerquera, R. R., Nogueira, C.U., Maffei, M. Non-destructive models to estimate leaf area on bell pepper crop. *Ciencia Rural.* 2016. 46(11), 1938-1944. doi: 10.1590/0103-8478cr20151324
- Neyra, S., Terrones, L., Toro, L., Zárate, B., Soriano, B. Efecto de la inoculación de *Rhizobium etli* y *Trichoderma viride* sobre el crecimiento aéreo y radicular de *Capsicum annum* var. *longum*. *Rebi-olest.* (2013). 1(1), 11-21. Retrieved from <http://revistas.unitrú.edu.pe/index.php/ECCBB/article/view/176>
- Martin, P. Echantillonnage du bananier pour l'analyse foliaire: Conséquences des différences de techniques. *Fruits.* 1997. 32(3), 151-166. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/faff/4f91db32b3d5c81fff1173ad9a758e1bed2.pdf>

24. Phillips, J. M., Hayman, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Brit Mycol Soc.* 1970. 55,158-161. doi: 10.1016/S0007-1536(70)80110-3
25. McGonigle, T. P., Miller, M.H., Evans, D.G., Fairchild, G.L., Swan, J. A. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 1990. 115(3), 495-501. doi: 10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x
26. Moya, J., García, S., Avilés, E., Andújar, F., Nuñez, P. Aislamiento de cepas de *Trichoderma* de suelos, sustratos y raíces de plantas en invernaderos en la República Dominicana. *Revista APF.* 2014. 3(2), 11-16. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/276355354_Aislamiento_de_cepas_de_Trichoderma_de_suelos_sustratos_y_raices_de plantas_en_invernaderos_en_la_Republica_Dominicana
27. French, E. R., Hebert, T. T. Aislamiento de fitopatógenos: Matilde M, editor(s). *Métodos de Investigación Fitopatológica.* San José de Costa Rica: Editorial IICA.1980. p. 154-167.
28. Barrera, V. A. El género *Hypocrea* Fr. (Hypocreales, Ascomycota) en la Argentina. Estudio de la variabilidad molecular de su estado anamórfico *Trichoderma*=*Hypocrea* Fr. (Hypocreales, Ascomycota) in Argentina. *Studies on the molecular variability of its anamorphic state Trichoderma.* Argentina: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 2012. 22-33. Retrieved from https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5226_Barrera.pdf
29. Folli-Pereira, M.D., Meira-Haddad, L.S. Nobre CM, Megumi MC. Plant-Microorganism Interactions: Effects on the Tolerance of Plants to Biotic and Abiotic Stress. In: Hakeem K, Ozturk M, Ahmad P, editor(s). *Crop Improvement: New Approaches and Modern Techniques.* Boston: Springer-Verlag New York Inc. 2013. p. 209-238. doi: 10.1007/978-1-4614-7028-1_6
30. Bernardo, L., Morcia, C., Carletti, P., Ghizzoni, R., Badeck, F., Rizza, F. Proteomic insight into the mitigation of wheat root drought stress by arbuscular mycorrhizae. *J Prot.* 2017. 169(3), 21-32. doi: 10.1016/j.jprot.2017.03.024
31. Pérez, U. A., Ramírez, M. M., Zapata, Y.A., Córdoba, J.M. Efecto de la inoculación simple y combinada con hongos formadores de micorriza arbuscular (HFMA) y rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) en plántulas micropropagadas de mora (*Rubus glaucus* L.). *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.* 2015. 6(1), 95-103. doi: 10.21930/rcta.vol16_num1_art:383
32. Rui-Xia, L., Feng, C., Guan, P., Qi-Rong, S., Rong, L., Wei, C. Solubilization of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. *Plos One.* 2015. 10(6), 1-16. doi: 10.1371/journal.pone.0130081
33. Montejo, J. L., Suárez, D. S., Carmenates, J. L., López, P. J. Aplicación de bioestimulantes a vitroplantas de plátano (*Musa sp.*). *Agrisost.* 2017. 23(1), 37-44. Retrieved from <https://core.ac.uk/download/pdf/268093092.pdf>
34. Acosta, E., Galindo, L. Efectos conjuntos de biobrás-16 y diferentes tiempos e intensidades de iluminación en plantas de banano in vitro (*Musa spp.* CV. FHIA-18) en la fase de aclimatación. *Tlatemoani Rev Acad de Invest.* 2016. 1(1), 48-62. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7286074>
35. Estrada-Luna, A., Davis, F. Arbuscular mycorrhizal fungi influence water relations, gas exchange, abscisic acid and growth of micro-propagated chile ancho pepper (*Capsicum annum*) plantlets during acclimatization and post-acclimatization. *J Plant Physiol.* 2003. 16(9), 1073-1083. doi: 10.1078/0176-1617-00989
36. Quiñones-Aguilar, E. E., López-Pérez, L., Rincón-Enríquez, G. Dinámica del crecimiento de papaya por efecto de la inoculación micorrizica y fertilización con fósforo. *Rev. Chapingo ser. Hortic.* 2014. 20(2), 223-237. doi: 10.5154/r.rchsh.2013.05.018
37. Villarreal, T. C., Medina, M. E., Ulloa, S. M., Darwin, R., Bangeppagari, M., Selvaraj, T., Sikandar, I. M. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and Azospirillum on growth and nutrition of banana plantlets during acclimatization phase. *J Appl Pharm Sci.* 2016. 6(6),131-138. doi:10.7324/JAPS.2016.60623
38. Barrera-Violeth, J., Oviedo-Zumague, L. E., Barraza-Álvarez, F. Evaluación de micorrizas nativas en plantas de plátano Hartón (*Musa AAB Simmonds*) en fase de vivero. *Acta biol Colomb.* 2012. 61(4), 315-324. Retrieved from https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/38131/40298
39. Castellanos, D. E., Rincón, J.M., Arguello, H. Evaluación del efecto de un biofertilizante ligado a un soporte orgánico mineral en un cultivo de lechuga en la Sabana de Bogotá bajo condiciones de invernadero. *Rev Colomb Cienc Hortic.* 2015. 9(1):72-85. doi: 10.17584/rchh.2015v9i1.3747
40. Sharma, N., Yadav, K., Aggarwal, A. Synergistic effect of arbuscular mycorrhizae and *Trichoderma sp.* on growth, nutrient uptake and yield of *Phaseolus Mungo* L. cultivars. *J. Trop. Plant Physiol.* 2016. 8, 23-31. Retrieved from [http://www.mspp.org.my/files/jtpp/jtppvol8/JTTP%20Vol%208%202016%20page%2023-31%20Phaseolus%20mungo%20\(3\).pdf](http://www.mspp.org.my/files/jtpp/jtppvol8/JTTP%20Vol%208%202016%20page%2023-31%20Phaseolus%20mungo%20(3).pdf)
41. Pírela-Almarza, Á.Y., Aguirre-Serpa, O.E., Ramírez-Villalobos, M.C., Petit, B., Bracho, B., Parra, I. Efecto de hongos micorrízicos arbusculares y del estiércol de ovino en el desarrollo inicial de la lechosa (*Carica papaya* L.) var. Maradol roja. *Bioagro.* 2018. 30(1), 79-86. Retrieved from http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S131633612018001000008&script=sci_abstract
42. López, A., Espinoza, J. Manual de nutrición y fertilización del banano. Una visión práctica de manejo de la fertilización. Quito, Ecuador: International Plan Nutrition Institute editor. 1995. Retrieved from [http://nla.ipni.net/ipniweb/region/nla.nsf/e0f085ed5f091b1b852579000057902e/c093707b0327c2fe05257a40005f359f/\\$FILE/N%20F%20Banano.002.002.pdf/N%20F%20Banano.pdf](http://nla.ipni.net/ipniweb/region/nla.nsf/e0f085ed5f091b1b852579000057902e/c093707b0327c2fe05257a40005f359f/$FILE/N%20F%20Banano.002.002.pdf/N%20F%20Banano.pdf)
43. Zhao, L., Zhang, Y. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. *J Integr Agric.* 2015. 14(8),1588-1597. doi: 10.1016/S2095-3119(14)60966-7
44. Kamaruzzaman, M., Rahman, M., Islam, M., Ahmad, M. Efficacy of four selective *Trichoderma* isolates as plant growth promoters in two peanut varieties. *Int J Biol Res.* 2016. 4(2),152-156. doi: 10.14419/ijbr.v4i2.6468
45. Navnita, S., Kuldeep, Y., Ashok, A. Growth response of two *Phaseolus mungo* L. cultivars induced by arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma viride*. *Inter J Agr.* 2016. 2,1-6. doi: 10.1155/2016/1524304

Received: 10 Septiembre 2020

Accepted: 28 September 2020

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Genetic transformation of apical meristematic shoots in the banana cultivar 'Williams'

Liliana Villao¹, José Flores^{1,2}, Efrén Santos-Ordóñez^{1,3}

DOI: 10.21931/RB/2021.06.01.4

Abstract: Bananas and plantains (*Musa spp.*) are among the most critical socioeconomic crops globally, being a staple food for millions of people in the tropics and an essential component for the export market, including the subtropics. Besides conventional breeding, genetic improvement of bananas and plantains could be performed through genetic engineering and new breeding techniques. Furthermore, plant tissue culture is essential for these technologies, including developing embryogenic cell suspensions and *in vitro* plants. The transient and stable genetic transformation could be performed from *in vitro* plants, shortening *Musa* transgenic lines development compared to genetic transformation while using embryogenic cell suspension. In this study, a genetic transformation protocol was established from banana apical meristems for the 'Williams' cultivar (genotype AAA). The protocol was based on the co-cultivation of the explants (whole *in vitro* plants or bisected meristematic tissues derived from *in vitro* plants) with *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 harboring two binary vectors denominated pLVCIBE1 (cassette: *MabHIPP* promoter::*luc2*::Tnos, P35S::*hpt*::Tnos) and pLVCIBE2 (cassette: P35S::*luc2*::Tnos, P35S::*hpt*::Tnos), independently. The stable genetic transformation was obtained by subculturing *in vitro* banana plants in selection medium (12.5 µg/mL of hygromycin) for 8 weeks from bisected meristematic tissue transformation. Genetic transformation was confirmed *in vivo* with the use of the luciferase reporter gene system. Furthermore, PCR was performed on DNA extracted from leaves of regenerated transgenic *in vitro* plants after 8 weeks of selection, confirming stable genetic transformation. Therefore, genetic transformation was achieved in the apical meristematic tissue of *in vitro* banana plants with co-cultivation of *Agrobacterium tumefaciens*.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, luciferase, micropropagation, promoter.

1462

Introduction

Banana and plantain crops (*Musa spp.*) have great importance in the tropics and some subtropical regions worldwide due to the export market and food security. In Ecuador, this fruit's consumption is massive and form part of the daily diet for millions of people¹. Banana and plantain crops are affected by biotic and abiotic stresses. Genetic improvement arises as an essential strategy to overcome reduced productivity due to different stresses in the crops. *Musa*'s conventional breeding is difficult due to different factors including high level of sterility, inrerploidy crosses, low rates of seed germination, and long cycle^{2,3}.

On the other hand, genetic engineering techniques are alternative tools for the conventional breeding process, which may overcome some of the issues, including sterility and length, for the genetic improvement because several crosses should be performed in conventional breeding^{2,3}. Therefore, the use of breeding technologies, including genetic engineering and recently, genome editing, has revolutionized genetic modification strategies for basic and applied science⁴. The search for a methodology to obtain *in vitro* banana transgenic plants in weeks after co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* was the objective of this research. Usually, six to twelve months could last to obtain transgenic *in vitro* banana plants after *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cell suspensions. Furthermore, the development of embryogenic cell suspensions could take eight to twelve months^{2,3,5,6,7}. Therefore, the genetic transformation from *in vitro* banana plants was performed through *Agrobacterium tumefaciens*; and confirmation of transformation was performed by using the luciferase reporter gene system and PCR.

Materials and methods

Plants preparation

Banana *in vitro* plants of the cultivar 'Williams' was obtained from the germplasm bank of the Tissue Culture area from CIBE-ESPOL. *In vitro*, plants were maintained according to Korneva *et al.*⁸.

Agrobacterium strains and plasmids

In this study, the *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA404 was used, and the binary vectors pLVCIBE1 and pLVCIBE2 were developed containing the gene cassettes PMabHIPP::*luc2*::Tnos and P35S::*luc2*::Tnos, respectively⁹. The selectable marker gene used was the *hpt* for hygromycin B resistance, fused to the CaMV 35S promoter.

The plasmids were transferred to agrobacteria by using 1 µg of DNA from plasmid mixed with *A. tumefaciens* competent cells strain LBA404. Briefly, the competent cells were frozen together with the plasmid using liquid nitrogen, then a heat shock treatment was given at 37°C for 5 minutes in a water bath, and finally, samples were incubated for 5 minutes on ice. Bacteria were incubated for four hours on YEP liquid medium (peptone 10g/L, yeast extract 10g/L, NaCl 5g/L) at 28°C on a shaker at 225 rpm. Samples were centrifuged for 30 seconds at 3000g, the supernatant was discarded, and cells were re-suspended in 100 µL of YEP liquid medium. The bacterial suspension was cultured into Petri dishes with YEP solid medium with 50 µg/mL of the antibiotics rifampicin (Sigma), and 50 µg/mL of kanamycin (Calbiochem). Samples were then incubated at 28°C for 2 days.

¹ ESPOL Polytechnic University, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Ecuador.

² Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil, Ecuador.

³ ESPOL Polytechnic University, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias de la Vida, Ecuador.

Preparation of *Agrobacterium* for genetic transformation using 'Williams' meristematic tissue

A single colony of *A. tumefaciens* was inoculated into 5 mL of liquid YEP medium containing kanamycin (50 µg/mL) and rifampicin (50 µg/mL) and grown overnight at 28°C on a rotary shaker at 200 rpm. An aliquot (1 mL) of the overnight culture was inoculated into 50 mL of liquid YEP medium containing the same antibiotics and allowed to grow at 28°C with vigorous shaking until the OD₆₀₀ reached approximately 0.8 units^{10,11}. The bacteria suspension was centrifuged at 5000 g for 10 minutes and resuspended in 25 mL of MS medium without antibiotics for 30 minutes at 25 rpm.

Inoculation and co-cultivation of explants

Co-cultivation of agrobacteria with banana explants was performed in MS culture medium supplemented with acetosyringone (200 µM) without antibiotics for 30 min at 100 rpm. After co-cultivation of agrobacteria with 'Williams' banana explants, a vacuum infiltration was performed at 400 mmHg for 10 minutes in MS medium supplemented with acetosyringone (200 µM) and maintained for 18 hours at 70 rpm in complete darkness. Two consecutive washes of 60 minutes each in fresh MS liquid medium were performed and maintained in darkness. After washing, the explants were maintained on sterile paper towels for drying, following subculture in semisolid MS medium, and incubation at 21°C for 3 days in complete darkness. After this time, the explants were subcultured in fresh semisolid MS medium, supplemented with Timentin (200 µg/mL) and hygromycin B (12.5 µg/mL) for 15 days at 25°C.

The same co-cultivation methodology was performed using two types of explants; i) whole *in vitro* plants (approximately 3-cm in height) without any excision, and ii) a bisected 2-cm region cut from the meristematic tissue of *in vitro* plants. For both cases, the banana cultivar 'Williams' (genotype AAA) was used (Fig. 1).

Luciferase (LUC) activity assay

For the transformation of the whole *in vitro* banana plants, luciferase activity assays were performed on explants after 15 days under a selection medium containing 200 µg/mL of Timentin and 12.5 µg/mL of hygromycin B (15 days after *Agrobacterium* infection). *In vitro* banana plants were transferred to sterilized 9-cm Petri dishes before the application of luciferin. The equipment STELLA3200 (Raytest, Germany) was used to detect LUC activity in complete darkness, using a CCD camera, after 20 µl of luciferin (500 µM) on the banana plants. The acquisition time was 1 min, and the data obtained were analyzed with the AIDA Raytest software (Raytest, Germany).

Selection and regeneration

For the excised bisected meristematic region, selection and regeneration were performed by subculturing on fresh BN semisolid medium supplemented with Timentin (200 µg/mL) and hygromycin B (12.5 µg/mL), with subculturing every two weeks on fresh medium at 25°C with a 16-h photoperiod for a total of eight weeks.

Polymerase chain reaction to detect transgenic events

To confirm the genetic transformation of the plants regenerated from the excised meristematic region after two months of co-cultivation with *A. tumefaciens*, a PCR was performed with specific primers to detect the nopaline synthase terminator (TnosF-1: GAATCCTGTTGCCGGTCTTG; and, TnosR-2: TTATCCTAGTTTGCGCGCTA), the expected amplicon size was 180 bp; and the *hpt* gene (HPTF-1: GATGTTGGC-GACCTCGTATT; and, HPTR-2: CACTGGCAAACCTGTGATGGA),

the expected amplicon size was 216 bp. DNA extraction was performed from leaf tissues using a CTAB modified protocol, according to Pacheco Coello *et al.*¹². PCR conditions include initial denaturation of 95°C for 3 minutes; then 30 cycles of 95°C for 30 seconds, 57°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds; with a final extension of 72°C for 5 minutes. The results were visualized on 1.2% agarose gels in 1X TAE buffer.

Results

Once the transformation and subculture process was completed, about 20 shoots were obtained from the meristematic tissue, and they were kept in MS culture medium in Petri dishes following subculture to glass flasks with the same medium changes to fresh culture medium every two weeks. After two weeks of *Agrobacterium* infection of *in vitro* plants, luciferase activity was detected in the banana plants transformed, showing expression in all banana tissues (Fig. 2). and seven out of ten putative transgenic lines tested showed PCR amplification (Fig. 3). Both results confirmed the genetic transformation using *in vitro* banana plants.

The protocol developed will facilitate plants' genetic transformation of different banana and plantain cultivars and other plant species¹³. It should also be emphasized that the methodology using *Agrobacterium tumefaciens* is one of the most used due to its simplicity in terms of techniques and can be used in different types of plant tissues such as those demonstrated in this research¹⁴.

Although the genetic transformation of embryogenic cell suspension in banana is preferred because transgenic chimeric plants are avoided; several studies developed transformation using meristematic or *in vitro* plants in *Musa* varieties (reviewed by López *et al.*¹⁵), indicating that this methodology is useful, which was confirmed in this study using luciferase reporter genes and PCR.

Conclusions

In this study, we demonstrated the genetic transformation of apical meristems from the *Musa* cultivar 'Williams', allowing the regeneration of transgenic plants in a short period. The *Agrobacterium* strain LBA4404 could genetically transformed *in vitro* plants of the banana cultivar 'Williams', by using hygromycin B (12.5 µg/mL) in the selection process. The luciferase reporter gene system was functional in banana by using the codon-optimized *luc2*. This transformation methodology could be used for gene functional studies or genetic improvement for (a)biotic stress resistance in banana and plantain.

Acknowledgments

The *MabHIPP* promoter was cloned from the plasmid pES-KUL7 donated by Professor Rony Swennen from KU Leuven.

Funding

Genetic transformation experiments were performed in the framework of the Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (grants PIC-08-0000300 and SENACYT-FWO-10-005); and the VLIR-UOS (grant "Folate Biofortification of Banana *Musa spp.*" ZEIN2014RIP25).

Competing interest

The authors declare no competing interest.

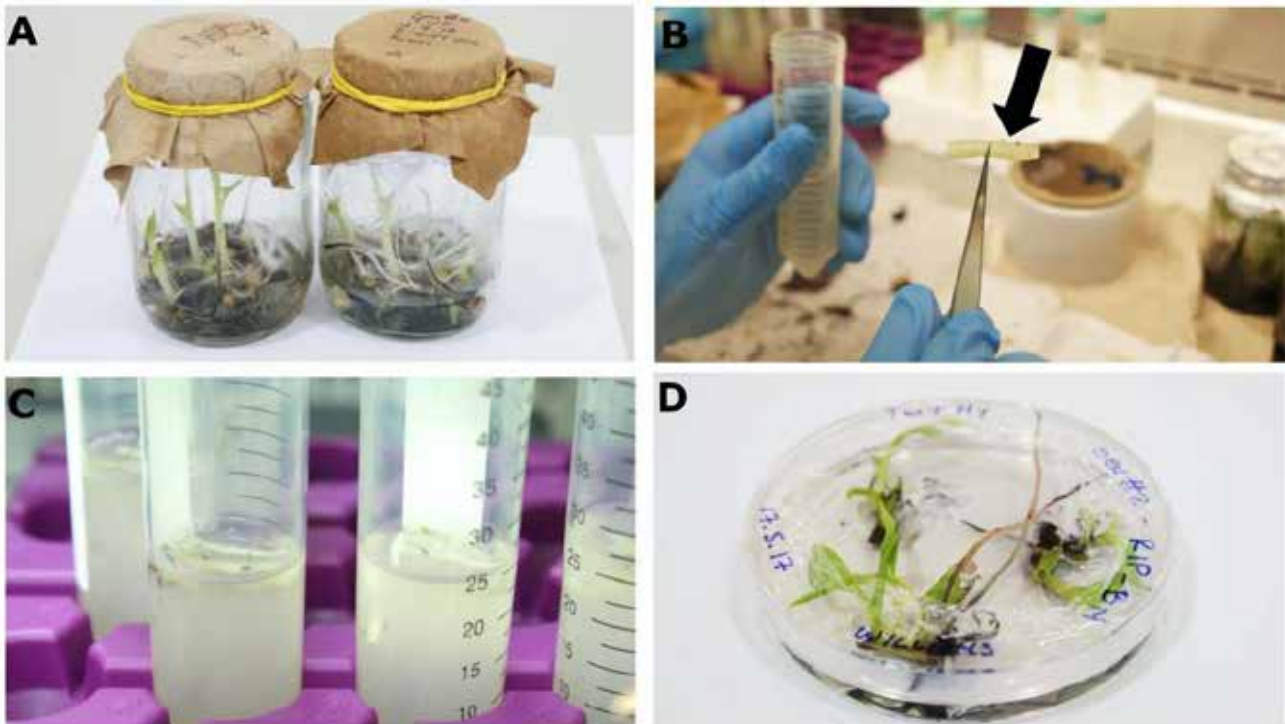


Figure 1. *In vitro* banana plants from the 'Williams' cultivar used for transformation. B. Excised bisected banana meristematic tissue region with approximately 2-cm in length (arrow). C. Co-culture process in MS medium supplemented with acetosyringone (200 μ M) and *Agrobacterium tumefaciens* with and O.D._{600nm} of 0.8 units D. Putative transgenic *in vitro* plants two months after the meristematic-transformation process in culture medium BN¹⁵.

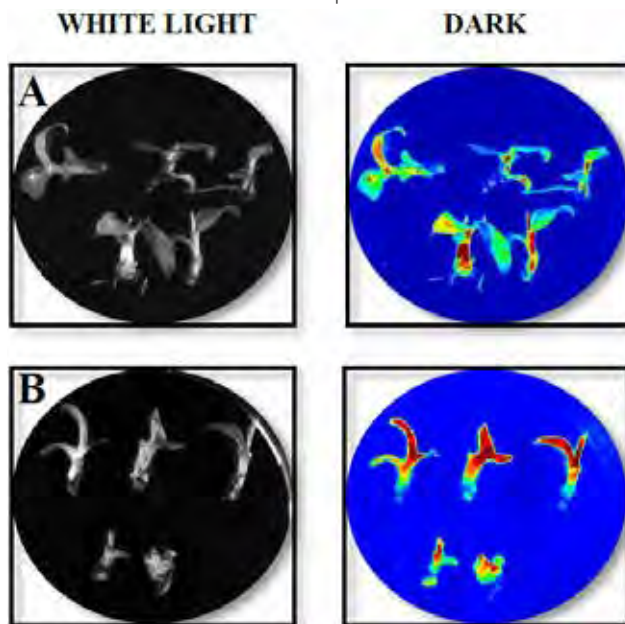


Figure 2. LUC activity assay of *in vitro* 'Williams' plants after 15 days of co-cultivation with *Agrobacterium-mediated* transformation of the whole *in vitro* plants. *In vitro* banana plants were transformed with vectors pLVCIBE1 [MabHIPP promoter,⁹] (A) and pLVCIBE2 (P35S promoter) (B). WHITE LIGHT indicates that the picture was acquired under light conditions, while DARK indicates the picture was acquired under complete darkness.

Bibliographic references

- Nelson, S. C., Ploetz, R. C., & Kepler, A. K. (2006). Musa species (bananas and plantains). In C. R. Elevitch (Ed.), Species profiles for Pacific Island agroforestry (pp. 1–33). Permanent Agriculture Resources (PAR).
- Sánchez Timm, L. E., & Santos Ordóñez, E. G. (2011). Estandarización del protocolo de transformación genética de células embriogénicas de banano de la variedad 'Williams' (AAA) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Revista Tecnológica - ESPOL, 23(1).
- Santos, E., Sánchez, E., Hidalgo, L., Chávez, T., Villao, L., Pacheco, R., Flores, J., Korneva, S. and Navarrete, O. (2016). Advances in banana transformation through *Agrobacterium tumefaciens* in Ecuador: progress, challenges and perspectives. Acta Hort. 1114, 197-202 DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1114.27
- Altpeter, F., Springer, N. M., Bartley, L. E., Et. al., (2016). Advancing Crop Transformation in the Era of Genome Editing. The Plant cell, 28(7), 1510–1520. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00196>.
- Sowmya, H. D., Usharani, T. R., & Mohandas, S. (2016). Somatic embryogenesis as a tool in genetic transformation. In Banana: Genomics and Transgenic Approaches for Genetic Improvement (pp. 141–155). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1585-4_10
- Santos, E., Sánchez, E., Hidalgo, L., Chávez, T., Villao, L., Pacheco, R., & Navarrete, O. (2016). Status and challenges of genetically modified crops and food in Ecuador. In Acta Horticulturae (Vol. 1110, pp. 229–235). International Society for Horticultural Science. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1110.33>



Figure 3. PCR detection of transgenic banana lines after two months of co-cultivation of *A. tumefaciens* with the bisected banana *in vitro* meristems. Agarose gel electrophoresis of PCR using primers to detect the terminator from nopaline synthase (upper level) and the hygromycin-B-phosphotransferase gene (lower level); both sequences contained in the vectors pLVCIBE1 and pLVCIBE2. Numbers at the left indicate reference sizes of DNA in base pairs (500 bp and 100 bp). Numbers 1-5 indicate independent transgenic banana lines for each construct. Vectors DNA for pLVCIBE1 and pLVCIBE2 are indicated as p1 and p2, respectively. MM refers to 100 bp molecular weight markers.

7. Santos, E., Pacheco, R., Villao, L., Galarza, L., Ochoa, D., Jordán, C., & Flores, J. (2016). Promoter analysis in banana. In *Banana: Genomics and Transgenic Approaches for Genetic Improvement* (pp. 157-179). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1585-4_11
8. Korneva, S., Flores, J., Santos, E., Pinã, F., & Mendoza, J. (2013). Plant regeneration of plantain "Barraganete" from somatic embryos using a temporary immersion system. *Biotechnologia Aplicada*, 30(4), 267-270.
9. Villao, L., Sánchez, E., Romero, C., Galarza, L., Flores, J., & Santos-Ordóñez, E. (2019). Activity characterization of the plantain promoter from the heavy metal-associated isoprenylated plant gene (MabHIPP) using the luciferase reporter gene. *Plant Gene*, 19. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2019.100187>
10. Rustagi, A., Jain, S., Kumar, D., Shekhar, S., Jain, M., Bhat, V., & Sarin, N. B. (2014). High Efficiency Transformation of Banana [*Musa acuminata* L. cv. Matti (AA)] for Enhanced Tolerance to Salt and Drought Stress Through Overexpression of a Peanut Salinity-Induced Pathogenesis-Related Class 10 Protein. *Molecular Biotechnology*, 57(1), 27-35. <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9798-1>.
11. Tripathi, L., Tripathi, J.N. & Hughes, J.D. (2005). Agrobacterium-mediated transformation of plantain (*Musa* spp.) cultivar Agbagba. *African Journal of Biotechnology*, 4(12), 1378-1383.
12. Pacheco Coello, R., Pestana Justo, J., Factos Mendoza, A. et al. Comparison of three DNA extraction methods for the detection and quantification of GMO in Ecuadorian manufactured food. *BMC Res Notes* 10, 758 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13104-017-3083-x>.
13. Hwang, H.-H., Yu, M., & Lai, E.-M. (2017). *Agrobacterium* -Mediated Plant Transformation: Biology and Applications. *The Arabidopsis Book*, 15, e0186. <https://doi.org/10.1199/tab.0186>.
14. Díaz Granados, Cristina, & Chaparro-Giraldo, Alejandro. (2012). MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15(1), 49-61. Retrieved September 22, 2020, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012342262012000100007&lng=en&tng=es.
15. Ortega Pérez, N. V., Korneva Korneva, S., Santos Ordóñez, E. G., Ruíz Barzola, O., & Peralta García, E. L. (2011). Obtención de Multimeristemos y Callos de Diferentes Variedades de Banano y Plátano (*Musa* spp.) a partir de "Meristemos Apicales" y "Scalps". *Revista Tecnológica - ESPOL*, 23(1).
16. López J., Santos-Ordóñez E., González L. (2020) Complementation of Bananas Conventional Breeding Programs Through Biotechnological Genetic Improvement. In: Chong P., Newman D., Steinmacher D. (eds) *Agricultural, Forestry, and Bioindustry Biotechnology and Biodiscovery*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51358-0_3

Received: 5 October 2020

Accepted: 10 November 2020

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Evaluación del efecto antagónico de una biopelícula con extractos de *Samanea saman* frente a *Colletotrichum gloeosporioides* responsable de la antracnosis en mango

Evaluation of the antagonistic effect of a biofilm with extracts of *Samanea saman* against *Colletotrichum gloeosporioides* responsible for anthracnose in mango

Miguel Moreno Paredes¹, Lenín Ramírez-Cando^{1,2}, Elisa Cedeño Luzardo³

DOI: 10.21931/RB/2021.06.01.5

Resumen: La actividad antagónica de extractos etanólicos (EE) e hidroetanólicos (EHE) de corteza y metanólicos (EM) de fruto de *Samanea saman* fue evaluada in vitro mediante el método de difusión en pozo frente al hongo patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*; responsable de la antracnosis, con el fin de evaluar su idoneidad para incorporarlos en recubrimientos biodegradables que ayuden en el control de enfermedades postcosecha en mango (*Mangifera indica*). Solo el EM mostro actividad inhibitoria significativa (CMI140µL/mL) en crudo, con un IC50 de 81,85µL/mL. Al aumentar la concentración del EM en el sistema recubrimiento-extracto de 140 µL/mL a 200 µL/mL se consiguió una respuesta inhibitoria considerablemente mayor, llevando el crecimiento micelial a niveles de reproducción bajo para el hongo en estudio. El tamizaje fitoquímico de los diferentes solventes mostró la presencia de metabolitos secundarios de manera variada; sin embargo, comparativamente el extracto metanólico (EM) del fruto presenta la mayor cantidad de estos compuestos tales como alcaloides, taninos, saponinas, terpenoides y resinas que han sido identificados por sus propiedades, como potentes antimicrobianos y antioxidantes naturales

Palabras clave: Antracnosis, biopelícula, *Colletotrichum gloeosporioides*, difusión en pozo, *Samanea saman*, tamizaje fitoquímico.

Abstract: The antagonistic activity of ethanolic (EE) and hydroethanolic (EHE) extracts from bark and methanolic (EM) from *Samanea saman* fruit was evaluated in vitro using the suitable diffusion method against the pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*; responsible for anthracnose, to evaluate their suitability for incorporation in biodegradable coatings that help control post-harvest diseases in mango (*Mangifera indica*). Only EM showed significant inhibitory activity (MIC140µL / mL) in crude oil, with an IC50 of 81.85µL / mL. By increasing the concentration of EM in the coating-extract system from 140 µL / mL to 200 µL / mL, a considerably higher inhibitory response was achieved, bringing mycelial growth to low reproduction levels the fungus under study. The phytochemical screening of the different solvents showed the presence of secondary metabolites in a varied way; However, comparatively, the methanolic extract (EM) of the fruit presented the highest amount of these compounds such as alkaloids, tannins, saponins, terpenoids, and resins that have been identified for their properties, as potent antimicrobials and natural antioxidants.

Key words: Anthracnose, biofilm, *Colletotrichum gloeosporioides*, well diffusion, *Samanea saman*, phytochemical screening.

Introducción

La antracnosis es la principal enfermedad postcosecha que afecta al mango a nivel mundial, su incidencia puede alcanzar casi el cien por ciento del total de fruta cosechada en zonas de alta humedad y fuertes precipitaciones¹; siendo el hongo *Colletotrichum* y su teleomorfo los patógenos más extendidos a nivel mundial, causantes de esta enfermedad². La antracnosis se ha posicionado como una de las principales causas por las cuales el mango ecuatoriano no puede ubicarse con ventaja en mercados internacionales frente a sus competidores directos³. Por este motivo, en la actualidad se ha desarrollado el uso e implementación de recubrimientos biodegradables o "biopelículas" que, junto con inhibir reacciones metabólicas asociadas con la maduración y mantener las propiedades mecánicas y sensoriales, pueden actuar en sinergia con agentes antimicrobianos y antioxidantes^{4,5}.

El *Samanea saman* es considerado como un árbol multipropósito; ya que no solo posee gran potencialidad como alimento alternativo para rumiantes y monogástricos en épocas de sequía, sino también por ser fuente importante de metabo-

litos secundarios que demuestran sinergismo y alto potencial antimicrobiano⁶; siendo la corteza y los frutos de este, identificados como las principales fuentes de estos metabolitos, específicamente de taninos condensados y alcaloides⁷.

Por las razones arriba expuestas, se hace imperativo el brindar alternativas innovadoras que ayuden al sector agroindustrial, y al desarrollo de su capacidad exportable; brindando al mercado internacional, productos de alta calidad organoléptica y de inocuidad alimentaria asegurada.

Estudios recientes han reportado que existen alrededor de 2400 especies vegetales con propiedades biocida; y de estos, 400 especies presentan propiedad fungicida contra 142 hongos diferentes. Los compuestos antimicrobianos pueden estar presentes en diferentes órganos de la planta, por ejemplo, en semillas, flores, tallos, raíces y hojas y su actividad depende de la concentración, método de extracción, edad de la planta y época de cosecha, entre otros⁸.

Diversos estudios han identificado a los compuestos activos responsables de estas propiedades antimicrobianas tales

¹ Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química, Guayaquil, Ecuador.

² School of Biological Sciences and Engineering, Yachay Tech University, Urququí, Ecuador.

³ Universitat Politècnica de Valencia, España.

*Corresponding author: mamoreno@espol.edu.ec

como fenoles, taninos, alcaloides, saponinas, terpenoides, cumarinas, glicosidos, entre otros⁸.

El *Samanea samán* además de su utilidad como alimento animal, tiene otros usos importantes como planta melífera, maderable y medicinal; y es justamente en este último aspecto, que resulta de mucho interés en la actualidad por ser una planta con actividad antimicrobiana debido a los compuestos secundarios presentes en ella⁹.

De manera empírica, las hojas, la corteza, la raíz, las semillas y las vainas del *Samanea saman* han sido usados en el sistema de medicina tradicional. El extracto alcohólico de las hojas inhibe al *Mycobacterium tuberculosis* y su infusión es usada como laxante, las semillas se mastican para tratar el dolor de garganta y la decocción de la corteza interna y las hojas frescas se usan para el tratamiento de la diarrea, los resfriados y enfermedades intestinales¹⁰.

La corteza, follaje y frutos secos tienen la más baja humedad; por lo que pueden ser conservados por largos periodos, volviéndose importantes desde el punto de vista investigativo. El Tamizaje fitoquímico realizado evidenció que en la corteza y los frutos aparecen identificados los mayores números de metabolitos secundarios; siendo los más abundantes alcaloides, taninos, carbohidratos, saponinas, aminoácidos, azúcares reductores y flavonoides⁷.

Tamizajes fitoquímicos efectuados a las vainas del *Samanea saman* revelan la presencia de metabolitos secundarios tales como saponinas, esteroides, alcaloides, taninos, flavonoides y resinas. Análisis cualitativos y cuantitativos encontraron que los taninos eran del tipo condensados y tienen un gran potencial antimicrobiano y anti fúngico⁶.

Los taninos han sido reportados por prevenir el desarrollo de microorganismos a través de la precipitación de la proteína microbiana y volviéndolas no disponibles para su metabolismo¹¹.

Ensayos de cloruro férrico a la corteza del *Samanea saman* han encontrado la presencia de abundantes taninos del tipo pirocatecolicos; además, en extractos más polares se detectaron azúcares, flavonoides, quinonas, y resinas⁷.

Evaluaciones del proceso de extracción de metabolitos secundarios del *S. saman* con diferentes solventes encontraron que el etanol brinda mejores características de recuperación para la corteza¹².

Análisis al proceso de extracción de metabolitos secundarios del *S. saman* con diferentes solventes encontraron que el metanol brinda mejores características de recuperación para el fruto¹³.

El uso de recubrimientos de frutas con biopelículas es una tendencia tecnológica que disminuye la pérdida de humedad, compuestos volátiles, disminución de la tasa de respiración y retarda la oxidación enzimática. Recubrimientos comestibles a partir de almidones obtenidos de fuentes como arroz o yuca han sido aplicados en toronja, piña, guayaba, pera y mango.

En mango, recubrimientos formulados con galactomananos no retrasan el ablandamiento y reducen la pérdida de peso, la actividad enzimática y la peroxidación lipídica¹⁴.

Las películas y recubrimientos comestibles están formados por tres componentes principales: polímero, solvente y plastificante. La incorporación de agentes antimicrobianos a biopelículas tiene como objetivo el extender la vida de anaquel de un producto y reducir el crecimiento de patógenos en la superficie de los alimentos.

Los diferentes agentes antimicrobianos que son incorporados a películas o recubrimientos comestibles por sus diversas características químicas forman parte de la estructura de la película mediante la interacción con el polímero y el plas-

tificante impidiendo que el compuesto antimicrobiano migre. Sin embargo, el avance de las técnicas analíticas ha puesto en duda la inocuidad de algunas sustancias antimicrobianas que se consideraban seguras; por lo cual, la tendencia actual se ha centrado en la búsqueda de agentes antimicrobianos de origen natural⁴.

La antracnosis es considerada la principal enfermedad fúngica que afecta al mango. Los hongos filamentosos del género *Colletotrichum* y su teleomorfo son considerados los patógenos de plantas más ampliamente distribuidos a nivel mundial. La variabilidad en la patogenicidad mostró que todas las especies de mangos son susceptibles al microorganismo.

La incidencia de antracnosis es de casi el cien por ciento en fruta producida en climas con alta humedad y fuertes precipitaciones¹⁵.

La más baja y segura temperatura a la que pueden ser expuestos los mangos verdes maduros por largo tiempo es de 12oC¹⁶.

La temperatura óptima de crecimiento para el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* es de 24±2oC².

La Food and Drug Administration (FDA) ha aprobado al método de "Difusión por Disco o en Pozo" (Disc-difussion method) como la técnica más usada para el análisis de actividad antimicrobiana de extractos y aceites esenciales en estudios preliminares¹⁷.

La técnica con sensidiscos presenta algunas desventajas; principalmente causadas por la composición del papel filtro "Whatman", que puede intervenir con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales evaluados impidiendo su difusión en el agar, este fenómeno es eliminado cuando el método se utiliza directamente en pozo¹⁸.

La efectividad del efecto antimicótico de diferentes extractos vegetales y sus constituyentes han sido calculados a través del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial¹⁹.

Este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto antagónico frente al hongo "*Colletotrichum gloeosporioides*"; que provoca antracnosis en mango (*Mangifera indica*) mediante la aplicación de una biopelícula con extractos de corteza y fruto de "*Samanea samán*" a través de la identificación de los métodos de extracción más idóneos para la mejor recuperación de metabolitos secundarios en los extractos de las matrices de corteza y fruto de "*Samanea samán*" mediante un tamizaje fotoquímico cualitativo. Posteriormente establecer las dosis mínimas inhibitorias; de entre los extractos con mejores perfiles de metabolitos secundarios de las matrices en estudio, frente a una cepa certificada de "*Colletotrichum gloeosporioides*" mediante un análisis *in vitro* CMI (Concentración Mínima Inhibitoria).

Y finalmente evaluar el efecto antagónico de soluciones formuladas de biopelícula/extractos de las matrices corteza y fruto de "*Samanea samán*" frente a una cepa certificada del hongo "*Colletotrichum gloeosporioides*" que produce antracnosis en mango (*Mangifera indica*).

Validando la hipótesis que la biopelícula con extractos de corteza y/o fruto de *Samanea samán* tienen efecto antagónico frente al hongo *Colletotrichum gloeosporioides* que provoca antracnosis en mango (*Mangifera indica*).

Materiales y métodos

Las muestras de corteza y fruto de *Samanea samán* fueron obtenidas de árboles maduros y visiblemente sanos del área recreativa "Sendero del Parque Samanes" ubicado en la parroquia Tarqui; en el sector norte de la ciudad de Guayaquil,

delimitados al norte por la Av. Casuarina, al Sur Av. S/N, al este por el río Daule y al oeste por la Vía a Daule con coordenadas geográficas: latitud ($2^{\circ}6'24.07''$ S) y longitud ($79^{\circ}54'52.69''$ W).

Mediante tres procedimientos se realizó la obtención de los extractos de las diferentes matrices del *Samanea samán* que fueron: extracto etanólico, hidro etanólico de corteza y metanólico de frutos tomando como referencia la metodología usada por Obasi Nnamdi *et al.*¹³.

Para el tratamiento de las matrices se usó como referencia la técnica presentada por Aguilar J. y Col.¹² procediendo de la siguiente manera:

Las muestras de corteza y fruto obtenidas de árboles maduros y visiblemente sanos se limpiaron manualmente para eliminar restos de materiales extraños luego se secaron al sol por un máximo de 72 horas con el fin de reducir la humedad superficial de las mismas. Posteriormente estas muestras fueron secadas en estufa por un máximo de 72 horas a una temperatura promedio de 60°C . Las muestras secas se molieron usando un molino de bolas hasta alcanzar un tamaño de partícula de $8\mu\text{m}$ validados por un tamiz #8 y se empacaron dos muestras molida de 60g de corteza en dos cartuchos de papel filtro whatman # 54 (tamaño de poro: 22mm) y colocadas cada una en un soxhlet de 300mL y 60g de muestra molida de fruto se empacaron en un cartucho de papel filtro whatman # 54 (tamaño de poro: 22mm) y colocadas en un soxhlet de 300mL.

Extracto Etanólico de Corteza de *S. samán*

Al cartucho que contiene la muestra molida se le adicionó 200mL de etanol al 96% de pureza y se puso en operación el sistema soxhlet a reflujo por 2 horas a 70°C .

Extracto Hidro-Etanólico de Corteza de *S. samán*

Al cartucho que contiene la muestra molida se le adicionó 200mL de una solución etanol al 96% de pureza y agua destilada en relación 1:1, se puso en operación el sistema soxhlet a reflujo por 2 horas a 70°C . Los extractos fueron sometidos a un proceso de concentración en un equipo rotavapor marca Heidolph por alrededor de 2 horas a una temperatura de 60°C y 20rpm por 3 horas aproximadamente. Los concentrados se enfriaron a temperatura ambiente, se depositaron en frasco ámbar con tapa y fueron refrigerados para los ensayos posteriores.

Para obtener el extracto del fruto, el procedimiento fue el siguiente:

Extracto Metanólico de Fruto de *S. samán*

Al cartucho que contiene la muestra molida se le adicionó 200mL de alcohol metanol, se puso en operación el sistema soxhlet a reflujo por 2 horas a 70°C . A continuación, este extracto se sometió a un proceso de concentración en un equipo rotavapor marca Heidolph por alrededor de 2 horas a una temperatura de 60°C y 20rpm por 2 horas aproximadamente y al final del proceso, el concentrado fue enfriado a temperatura ambiente, depositado en frasco ámbar con tapa y refrigerado para los ensayos posteriores.

Tamizaje Fitoquímico de los Extractos

A los tres extractos se les aplicó un ensayo de tamizaje fitoquímico; de acuerdo con los métodos descritos por Evans *et al.*²⁰ y Harborne²¹, con el fin de determinar cualitativamente la presencia o ausencia de metabolitos secundarios de interés antagónico frente a hongos. Estos análisis fueron: Test para Alcaloides: Test de Dragendorff's, Test de Mayer, Test de Wagner, Test del ácido pícrico (1%), Test para Flavonoides: Test del

Amonio y Test del Cloruro de Aluminio, Test para Glicósidos, Test para Esteroides y Terpenoides, Test para Saponinas: Test de Emulsión, Test del froting, Test para Taninos: Test del Subacetato de plomo, Test del cloruro Férrico, Test para compuestos ácidos, Test para resinas: Test del precipitado y Test del color.

Elaboración de Biopelícula

Para el presente trabajo se usó una biopelícula a base de almidón de yuca y gelatina de bovino, que cuenta con excelentes propiedades mecánicas de dureza, resistencia y extensibilidad; así como, acción de barrera semipermeable a la humedad y al oxígeno, propuesta por Acosta Dávila²².

La biopelícula propuesta está estructurada por tres componentes: Polímero: Solución de gelatina de origen bovino (2% S.T.) y Almidón de yuca (2% S.T.) en una relación 50:50. Plastificante: Glicerol (0,5% del total de la mezcla) y Solvente: Agua destilada.

Activación del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*

Para las pruebas antagónicas de los extractos de corteza y fruto de *S. samán*, se usó una cepa certificado por el Centro de Investigación Biotecnológica del Ecuador (CIBE) del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* spp., con código MCIBE-H148.

Las muestras recibidas del hongo *C. gloeosporioides* fueron activadas tomando una muestra visible del hongo y pre enriqueciéndolas en un caldo de cultivo BHI (Brain Heart Infusion Broth) de "Titan Biotech Limited", para luego ser inoculadas en agar inclinado PDA (Potato Dextrose Agar) de "DIFCO" por 5 días a $24\pm 2^{\circ}\text{C}$. Los parámetros tomados en cuenta para este proceso son temperatura de incubación: $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, tiempo de incubación: 5-7 días y aislado de la luz.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos crudos de corteza y fruto de *Samanea samán* frente a cultivos puros de *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro

Para la determinación de la CMI, se ensayaron en primera instancia varias concentraciones de los tres tipos de extractos analizados (200, 175, 150, 125, 100, 50, 25, 12.5 mgL^{-1}) mediante el uso de placas multipozos (96 pozos) adicionando en cada uno de estos 100 mgL^{-1} de agar PDA, 20 mgL^{-1} del hongo y las diferentes concentraciones a ensayar en un número de cuatro replicas por concentración ensayada. Estas placas fueron incubadas a $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas en incubadora.

Una vez determinado el tipo de extracto y las concentraciones con los mayores efectos inhibitorios, se sometieron estas concentraciones (90, 100, 110, 120 y 130 mgL^{-1}) del extracto metanólico (EM) a un nuevo análisis a través del uso de placas multipozos (96 pozos) usando la mismas dosificaciones y condiciones de incubación que en el proceso previo, en un número de diez replicas por concentración ensayada.

Con la identificación de las concentraciones con mayores perfiles inhibitorios (120, 130 y 140 mgL^{-1}) del extracto metanólico (EM), se procedió a realizar el ensayo para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a través de la técnica del pozo en placa con siembra por estrías.

Cada placa con 20 mL de agar PDA fueron inoculadas con cultivo fresco del hongo *C. gloeosporioides* mediante la técnica de estrías con asa, posteriormente se procedió a realizar un pozo en el centro de la placa mediante el uso del segmento ancho de una punta de micropipeta de 9mm de radio y 5mm de profundidad aproximadamente. En estos pozos fueron depositados las concentraciones a ensayar por cuadruplicado ($120, 130$ y 140 mgL^{-1}) del extracto metanólico (EM). Se usaron testigos del crecimiento del hongo mediante la incubación de

un blanco (agar PDA), Control (agar+hongo) y Solvente (agar+metanol) en concentraciones de 60 mgL⁻¹ y 120 mgL⁻¹ para el solvente, estas placas fueron incubadas por 7 días a 24±2oC.

La metodología para la recolección de los datos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto metanólico (EM); a través de la medición de los halos de inhibición, fueron tomados del trabajo de (Awerbuch & Lustman, 1987)²³. Los datos fueron registrados y se determinó las medias de los halos de inhibición con su respectivo error estándar para cada lectura; así también, con estos datos procesados se construyó una curva de respuesta inhibitoria para determinar los IC10, IC50 e IC90.

Determinación del efecto antagonístico del sistema Biopelícula: Extracto de *Samanea saman* frente a cultivos puros de *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro:

Con la identificación de la CMI del extracto metanólico (EM) en la sección anterior, se procedió a formular un sistema de Biopelícula:Extracto (1:0,14) respectivamente, considerando los tiempos de agitación para la homogenización del sistema por 1 min y 5 min respectivamente.

Se procedió a tomar cada placa con 20 mL de agar PDA y a inocularlas con cultivo fresco del hongo *C. gloeosporioides* mediante la técnica de estrías con asa, posteriormente se procedió a realizar un pozo en el centro de la placa mediante el uso del segmento ancho de una punta de micropipeta de 9mm de radio y 5mm de profundidad aproximadamente. A las placas inoculadas se les adiciono 1 mL del sistema Biopelícula:Extracto, cada ensayo se realizó por quintuplicado y para los dos tiempos de homogenización planteados, estas placas fueron incubadas por 7 días a 24±2oC.

Con los resultados obtenidos del crecimiento micelial, se procedió a realizar un ensayo adicional aumentando la concentración del sistema Biopelícula:Extracto (1:0,2) con un tiempo de agitación de 5 minutos y los resultados fueron recogidos, enlistados y analizados en la siguiente sección.

Resultados y discusión

Tamizaje Fitoquímico

Con los ensayos completados del tamizaje fitoquímico se observó que en el extracto metanólico (EM) del fruto hubo presencia de alcaloides, glucósidos, esteroides, terpenoides, saponinas, taninos y resinas; mientras que hubo ausencia de flavonoides y compuestos ácidos que coinciden con los resultados obtenidos por Obasi *et al.*¹³. Los resultados también mostraron que para los solventes más polares del estudio el extracto etanólico (EE) de la corteza mostró únicamente presencia de esteroides, terpenoides y saponinas; así como, para el extracto hidroetanólico (EHE) también de la matriz corteza, solamente tuvo presencia de esteroides, saponinas y resinas, difiriendo de los resultados expuestos por Milian-Dominguez *et al.*⁷ exceptuando solo para los contenidos de saponinas y resinas.

Estos resultados nos brindaron una valiosa visión de las características de cada matriz y solvente usado para la obtención de los diferentes extractos, encontrando prometedoros resultados para el extracto metanólico del fruto del *S. saman* respecto de su contenido de metabolitos secundarios; específicamente hablando de los alcaloides, saponinas y taninos; estos últimos comúnmente conocidos como ácido tánico y reportados por su elevado potencial antimicrobiano y anti fúngico según Naveen-Prasad R. *et al.*¹¹, Tabla 1.

Al completar los ensayos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los extractos puros; luego de un análisis estadístico, se encontró que la dosis de 140uL del extracto metanólico (EM) presento la media más alta de inhibición para el hongo estudiado (*C. gloeosporioides*); este resultado difiere completamente de los datos presentados por Obasi N. y Col. (2010)¹³ quien no encontró efectos inhibitorios significativos de los extractos metanólicos del fruto frente a las cepas de hongos estudiadas a concentraciones de 10 mgmL⁻¹ a 100mgmL⁻¹. Por otro lado, los resultados obteni-

ENSAYO PARA METABOLITOS SECUNDARIOS	EE	EHE	EM
ALCALOIDES			
Test de Draggendorf s	-	-	+
Test de Mayer	-	-	+
Test de Wagner	-	-	+
Test del ácido picrico	-	-	+
FLAVONOIDES			
Test del amonio	-	-	-
Test del cloruro de Aluminio	-	-	-
GLICOSIDOS	-	-	+
ESTEROIDES	+	+	+
TERPENOIDES	+	-	+
SAPONINAS			
Test de emulsión	+	+	+
Test del froting	+	+	+
TANINOS			
Test del subacetato de plomo	-	-	+
Test del cloruro férrico	-	-	+
COMPUESTOS ACIDOS	-	-	-
RESINAS			
Test del precipitado	-	+	+
Test del color	-	+	+

Tabla 1. Resultados experimentales tamizaje fitoquímico.EE(Extracto Etanólico 96%) Corteza *S. saman*).EHE (Extracto Hidroetanólico (50:50) Corteza *S. saman*). EM (Extracto Metanólico Fruto *S. saman*). Presencia (+), Ausencia (-).

dos en este trabajo se presentan con ventaja frente a los resultados expuestos por Aguilar-Alonso *et al.*²⁴ quienes reportaron un CMI para extractos etanólicos de ruda y pirúl de 150mgL⁻¹ y 300mgL⁻¹ respectivamente, mientras que Avila-Sosa *et al.*⁴ reportaron valores de CMI del orden de 400mgL⁻¹ en extractos etanólicos de orégano mexicano, jarilla y pericón, por lo que la concentración identificada del EM presento ventajas in vitro competitivas en comparación con los trabajos en referencia para ser usada como el agente biocida en la biopelícula (Tabla 2).

EM (µL)	CMI	
	Rtox	Rmut
120	4,075±0,2986	4,875±0,2394
130	5,625±0,4787	6,375±0,2394
140	7,625±0,4787	8,75±0,1443

Tabla 2. Resultados de la media y error estándar de los halos de inhibición para los extractos metanólicos (EM) puros. rtox (radio de la zona de toxicidad), rmut (radio de la zona de mutagenocidad), CMI (Concentración mínima Inhibitoria).

Así también, con las lecturas de inhibición se construyó una curva de respuesta con la que se encontró para este extracto crudo (EM) un IC10= 61,05 µL, IC50=81,8557 µL y IC90=107,99 µL. (Tabla 3).

EM (200, 100, 50, 25,12.5) µL		
IC10	IC50	IC90
61,05	81,8557	107,99

Tabla 3. Valores de respuesta inhibitoria para los extractos metanólicos (EM) puros.

La curva de supervivencia (Figura 1) nos permite obtener la función específica con la que se puede determinar el porcentaje de supervivencia (IC) para este extracto puro.

$$Fic = \frac{-0,0182 + (1,0115 - (-0,0182))}{1 + (\frac{x}{EC50})^{-(-7,5360)}}$$

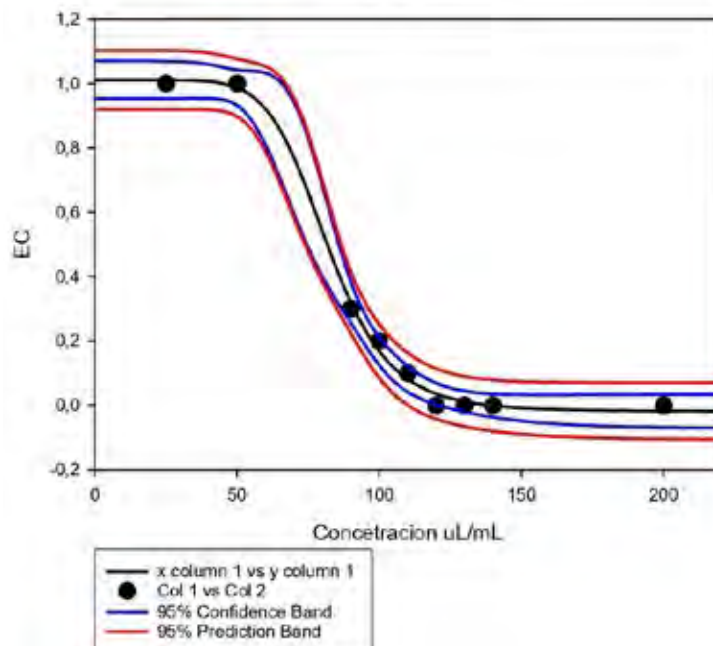


Figura 1. Curva de respuesta inhibitoria del extracto metanólico (EM) puro.

En la evaluación del efecto antagónico de los sistemas biopelícula: extracto, se determinó que para las dosis de 140µL/mL, el factor de agitación influye tácitamente en la respuesta inhibitoria frente al hongo en estudio. Al aumentar el tiempo de agitación de 1 minuto a 5 minutos, la respuesta antagónica a esta concentración fue mayor llevando el crecimiento micelial a un nivel de reproducción medio, lo que esto presenta un descubrimiento innovador para este tipo de investigaciones, donde sus análisis se han concentrado en los efectos inhibitorios generados por el tipo de sustancia antimicrobiana y su concentración, sin tomar en cuenta el efecto de la difusión de los extractos en el polímero, como un parámetro promotor de la función biocida de los sistemas. (Tabla 4).

Al aumentar la concentración del extracto en el sistema a 200µL/mL, se observó una respuesta inhibitoria considerablemente mayor, consiguiendo un nivel de reproducción *in vitro* bajo para el hongo *C. gloesporioides* responsable de la antracnosis en mango (*Mangifera indica*), estos resultados tienen un comportamiento más estable respecto de los valores reportados por Ribeiro-Goncalves *et al.*²⁵ quienes presentaron datos bastantes dispersos de inhibición in vitro que van desde 15mL⁻¹ como la concentración de mayor inhibición, hasta 6000mL⁻¹ para la concentración de menor efecto en extractos comerciales naturales.

Por otro lado, trabajos presentados por Maqbool M. *et al.*²⁶ encontraron efectos fungicidas en sistemas goma arábica (GA) al 10% y aceite esencial de limoncillo (LG) y canela (CM) al 0,05% y 0,4% respectivamente, lo que nos da una relación 1:0,08 y 1:0,01 para cada sistema y Bosquez-Molina E. *et al.*²⁷ reportaron niveles de reducción de la incidencia de *C. gloesporioides* del 100% en sistemas goma mezquite al 5% y aceite esencial de tomillo (0,1%) y Lima mexicana (0,5%) que en relación con el presente trabajo tendríamos una formulación 1:0,02 y 1:0,01 polímero extracto lo que nos indica claramente que las características de la biopelícula inciden directamente sobre la acción fungicida de los extractos. Para todas las dosis ensayadas en el análisis de la respuesta antagónica del sistema, se

Placa	Extracto (µL/mL)	Agitación (min)	Crecimiento Micelial		
			Bajo	Medio	Alto
BioP 1	140	1			+++
BioP 2	140	1			+++
BioP 3	140	1			+++
BioP 4	140	1			+++
BioP 5	140	1			+++
BioP 1	140	5		++	
BioP 2	140	5	++		
BioP 3	140	5	+		
BioP 4	140	5		+	
BioP 5	140	5		+	
BioP 1	200	5	+++		
BioP 2	200	5	+++		
BioP 3	200	5	+++		
BioP 4	200	5	+++		
BioP 5	200	5	+++		

Tabla 4. Resultados del efecto antagonístico de los sistemas Biopelícula:Extracto (EM) de *Samanea samán* frente a *C. gloeosporioides*.

encontró que las placas después del día cinco de incubación presentaban un crecimiento de colonias negras con una taxonomía parecida al género *Aspergillus*, lo que ratifica la premisa propuesta por Lopez-Malo A. *et al.*²⁸ de que el crecimiento radial de las cepas de hongos están directamente relacionadas no solo con la concentración del agente antimicrobiano y el tipo de polímero como dispersante; sino también, la actividad de agua (Aw) y el pH como factores fundamentales para una óptima funcionalidad del sistema.

Conclusiones

De manera general, conocemos que los metabolitos secundarios de mayor interés antimicrobianos están identificados como alcaloides, taninos y saponinas; y están estos justamente presentes de mejor manera, en el extracto metanólico (EM) del fruto del *Samanea samán*, por lo que el estudio identifica claramente a la matriz y al solvente como los medios para la mejor extracción de estos compuestos. Así también, el presente trabajo introdujo al tiempo de agitación para la difusión del extracto en la biopelícula como un parámetro innovador en términos investigativos, ya que influye directamente sobre la respuesta antagonística de estos sistemas.

Finalmente, el estudio nos muestra que la composición del polímero también influye directamente en la respuesta inhibitoria del extracto en el sistema; y promueve la aparición de microorganismos competitivos, presumiblemente por una modificación de las condiciones de pH y la actividad de agua (Aw) de la biopelícula originalmente.

Referencias bibliográficas

1. Arauz, Luis Felipe. Mango Anthracnose: Economic Impact and Current Options For Integrated Management. *Plant Disease*.2000. 84(6), 600-611. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.6.6002>.
2. Valdés, L. A., Calero Consuegra, D. L., Gómez, A., Carballo, M. E., Capote, M., González, I., ... Rohde, W. Caracterización morfológica, cultural y patogénica de aislados de *Colletotrichum* sp. produciendo antracnosis en mango (*mangifera indica* L.). *La Granja*, (2017). 26(2), 38. <https://doi.org/10.17163/lgr.n26.2017.04>

3. Funes, M. J. B., & Salazar, J. E. C. (s. f.). Factores que inciden en la innovación tecnológica y productiva del sector del mango en el Ecuador. 13.
4. Avila-Sosa, R., & Lopez-Malo, A. Aplicación de sustancias antimicrobianas a películas y recubrimientos comestibles. *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos*, (2008). 2, 10.
5. Vázquez-Briones, M. C., & Guerrero-Beltrán, J. A. Recubrimientos de frutas con biopelículas. (2013). 10.
6. Delgado, D. C., Hera, R., & Cairo, J. (s. f.). *Samanea saman*, árbol multipropósito con potencialidades como alimento alternativo para animales de interés productivo. 9.
7. Milián Domínguez, J. C., Monroy, O. I., & Valdés, H. (s. f.). Caracterización fitoquímica de *Samanea Saman* (Jacq.) Merr. (Algarrobo). (2017). 5, 13
8. Gutierrez Martinez, P., Bautista Baños, S., & Barrera Necha, L. Uso potencial de extractos vegetales, aceites esenciales y quitosano para reducir el daño causado por hongos postcosecha en productos hortofrutícolas. *Avances en ciencia y tecnología alimentaria en México*, (2013).1(1). Disponible en : <https://www.researchgate.net/publication/272623331>
9. Delgado, D. C., Hera, R., & Cairo, J. (s. f.). *Samanea saman*, árbol multipropósito con potencialidades como alimento alternativo para animales de interés productivo.9.
10. Iqbal Azhar, M., Mohtasheemul, H., & Farah Mazhar, A. Some biological evaluations on *Samanea saman*. *Pakistan Journal of Pharmacology*, (2009). 26(1), 47-53.
11. Prasad, R. N., Viswanathan, S., Devi, J. R., Nayak, V., Swetha, V. C., Parathasarathy, N., & Rajkumar, J. (s. f.). Preliminary phytochemical screening and antimicrobial activity of *Samanea saman*. 3.
12. Aguilar López, J., Jaén Jiménez, J. C., Vargas Abarca, A. S., Jiménez Bonilla, P., Vega Guzmán, I., Herrera Núñez, J., ... Soto Fallas, R. M. Extracción y evaluación de taninos condensados a partir de la corteza de once especies maderables de Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, (2012). 25(4), 15. <https://doi.org/10.18845/tm.v25i4.615>
13. Obasi Nnamdi, L., Egbounu Anthony, C. C., Ukoha Pius, O., & Ejikeme Paul, M. Comparative phytochemical and antimicrobial screening of some solvent extracts of *Samanea saman* (fabaceae or mimosa) pods. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, (2010). 4, 206-212.
14. Vázquez-Briones, M. C., & Guerrero-Beltrán, J. A. Recubrimientos de frutas con biopelículas. (2013). 10.
15. Bartz, D. J. A., & Brecht, Dr. J. K. (s. f.). Reporte Final sobre potenciales modificaciones en el empaque de mango para mejorar el control postcosecha de antracnosis. 10

16. Brecht, J. K. Manual de Practicas para el Mejor Manejo Postcosecha del Mango. National Mango Borad. (2009).
17. Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, (2010). 21(9), 1199-1218. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>
18. Stella-Ramirez, L., & Marín, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Xv*, 42, 263-268
19. Thippeswamy, S., Praveen, P., Mohana, D.C., & Manjunath, K. (2011). Antimicrobial Evaluation and phytochemical analysis of a known medicinal plant *Samanea saman* (Jacq.) Merr. Against some human and plant pathogenic bacteria and fungi. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(2).
20. Evans, W. C., Evans, D., & Trease, G. E. (2009). *Trease and Evans pharmacognosy* (16th ed). Saunders/Elsevier.
21. Harborne, J. B. *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis* (1998). (3rd ed). Chapman and Hall.
22. Acosta Davila, S. Propiedades de films de almidon de yuca y gelatina. Incorporacion de aceites esenciales con efecto antifungico. Universidad Politecnica de Valencia. (2014).
23. Awerbuch, T. E., & Lustman, L. A mathematical model for determining minimal inhibitory concentrations (MICs) via diffusion assays. *Journal of Theoretical Biology*, (1987). 129(2), 219-230. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(87\)80014-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(87)80014-0)
24. Aguilar-Alonso, P., Navarro-Cruz, A. R., Sánchez-Flores, A. B., Ávila-Sosa, R., & Meneses-Sánchez, M. D. la C. Efecto antifúngico de extractos de plantas originarias del estado de Puebla sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. *CienciaUAT*, (2013). 7(2), 06. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v7i2.17>
25. Ribeiro, J. G., Serra, I. M. R. de S., Araújo, M. U. P., Ribeiro, J. G., Serra, I. M. R. de S., & Araújo, M. U. P. Uso de produtos naturais no controle de antracnose causado por *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. *Summa Phytopathologica*, (2016). 42(2), 160-164. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2023>
26. Maqbool, M. Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, (2011). 6.
27. Bosquez-Molina, E., JesAos, E. R., & Bautista-BaA, S.. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. *Postharvest Biology and Technology*, (2010).6
28. Lopez-Malo, A., Alzamora, S. M., & Palou, E. *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology*, (2005).10.

Received: 22 noviembre 2020

Accepted: 7 enero 2021

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Selección de variedades de frijol común rojo (*Phaseolus vulgaris* L.), tolerantes a la sequía en diferentes condiciones de riego en campo

Selection of varieties of common red bean (*Phaseolus vulgaris* L.), tolerant to drought in different irrigation conditions in the field

Amalia Domínguez Suárez¹, Rodolfo Darías Rodríguez¹, Yordanys Martínez Dávalos¹, Maryla Sosa del Castillo¹, Daynet Sosa del Castillo²

DOI: 10.21931/RB/2021.06.01.6

1473

Resumen: El objetivo del presente trabajo fue seleccionar variedades de frijol rojo más tolerantes a la sequía, en condiciones experimentales de sequía, en Campo. Para ello se realizó un experimentos con cinco variedades de frijol común de color rojo (Buenaventura, CC 25-9 rojo, Velazco Largo, La Cuba 154 y Delicia 364), en diferentes condiciones de humedad del suelo. Se evaluaron indicadores fenológicos y de rendimiento, en condiciones diferentes de riego, cinco riegos (sequía) y 10 riegos (condiciones óptimas de humedad). Con los datos de rendimientos en las dos condiciones de humedad se calculó el porcentaje de pérdidas del rendimiento, los índices de intensidad de sequía (IIS) y susceptibilidad a la sequía (ISS). El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa InfoStat versión 2011. Se llegó a la conclusión que las variedades Cuba Cueto 25-9 colorado, La Cuba 154 y Delicia 364 fueron las que tuvieron el comportamiento más tolerante en las condiciones de experimentación.

Palabras clave: frijol común, riego, tolerancia a sequía, rendimiento.

Abstract: The present work's objective was to select more tolerant varieties of red beans to the field's drought. It came right one experiment with five varieties of red-colored common beans (Buenaventura, CC 25-9 colorado, Velazco Largo, La Cuba 154, and Delicia 364) different conditions of soil water. Indicators of performance were evaluated in different irrigation conditions, 5 irrigations (drought), and 10 irrigations (optimal humidity conditions). With the yield data in the two conditions of humidity, the intensity of drought (IIS), drought resistance (ISS), and yield losses were calculated. The statistical analysis was accomplished using the program InfoStat version 2011. It took place to conclude that the studied varieties showed the most tolerant behavior in Cuba Cueto 25-9 Rojo, La Cuba 154 y Delicia 364.

Key words: Common bean, irrigation, tolerance to drought, yields.

Introducción

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) forma parte del grupo de las leguminosas comestibles, es importante no solo por sus propiedades nutricionales y culinarias, sino además por su presencia en los cinco continentes del mundo y su importancia para el desarrollo rural y social de muchas economías¹. Este producto es un alimento tradicional en América Latina y el Caribe².

El cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) al igual que otros cultivos de importancia económica se afecta durante el crecimiento y desarrollo por factores bióticos y ambientales adversos (abiótico) como: precipitación, temperatura, humedad, luminosidad y mala distribución del área cultivada³. Así como factores edáficos que varían entre localidades como: topografía, profundidad del suelo y época de siembra que puede favorecer la aparición de plagas y enfermedades. Además influye la falta de cultivares adaptados al medio ambiente, incluso a los cambios climatológicos a nivel global, por lo que es importante contar indicadores morfológicos y agronómicos para caracterizar cultivares y líneas en diferentes épocas de cultivo³.

Se reporta en la literatura que el estrés por sequía, causado por la baja disponibilidad de agua en el suelo, modifica negativamente la productividad del frijol^{4,5}. Esta puede ser más o menos afectada dependiendo de la intensidad y duración de la escasez de agua, de la rapidez con la cual se alcance dicha intensidad y además de la etapa fenológica en que el efecto ocurra, así como el pre acondicionamiento de la planta⁶.

Agunas de estas modificaciones se consideran respues-

tas metabólicas que constituyen mecanismos de adaptación al déficit hídrico en las plantas⁷. Se destacan por su correlación positiva con la tolerancia a la sequía la longitud de la raíz y su relación con la producción de biomasa⁸, el índice de marchites y el contenido relativo de agua de las hojas⁹, tanto en la fase vegetativa como reproductiva.

En la fase reproductiva en frijol y otras leguminosas disminuye el rendimiento en mayor proporción, que cuando solo afecta la fase vegetativa^{10,11}, lo que depende de la intensidad del estrés hídrico y la tolerancia del cultivar. por lo que varios autores han tenido en cuenta los indicadores fenológicos, la pérdida de rendimiento y el índice de susceptibilidad a la sequía, en estudios de evaluación y selección de variedades de frijol tolerantes a la sequía^{6,12,13}.

En nuestro país muchas de las áreas donde se produce frijol, son cultivadas con un suministro de agua dependiente de la precipitación. De ahí la importancia de seguir profundizando en el estudio de variedades comercializadas en Cuba. Este trabajo tuvo el objetivo de seleccionar cultivares tolerantes a la sequía, en condiciones de campo, con un rendimiento adecuado.

Materiales y métodos

El experimento se realizó en la finca "Sabanilla" de la CCS "Victoria de Girón" que está enclavada en el municipio de

¹ Centro de Estudios Biotecnológicos, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Matanzas, Cuba.

² Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Guayaquil, Ecuador.

Unión de Reyes, en el poblado Juan G. Gomez, en la provincia de Matanzas, Cuba, la cual cuenta con una extensión de 13,5 ha. El suelo es pardo Mullido Carbonatado¹⁴, con un contenido de materia orgánica entre medio y alto, el pH es neutro y el contenido de P₂O₅ fue de 1,45 mg/100 g y el de K₂O de 24,75 mg/100g, los cuales están dentro de los rangos permisibles para el cultivo del frijol, recomendando añadir materia orgánica y no fertilizante. Durante la duración del ensayo la temperatura media fue de 21,35 °C y el promedio de precipitación de 8 mm.

La investigación se realizó, en los meses de enero a marzo de 2018, las temperaturas (máxima, y mínimas) fueron variables, donde las temperaturas medias oscilaron entre 22 y 29 °C las temperaturas mínimas oscilaron entre 15 y 27 °C y las máximas entre 28 y 31 °C. Por otro lado, los valores de humedad relativa oscilaron entre 32 y 78%. Ambos valores permisibles para el desarrollo del cultivo. El promedio de precipitaciones fluctuó entre 9-60 mm, según el centro Meteorológico Unión de Reyes.

Se utilizaron cinco variedades de frijol común de color rojo: Buenaventura, Velazco Largo, Cuba Cueto rojo (R), La Cuba154 y Delicia 364, todos suministrado por la empresa de semilla de Jovellanos, Matanzas.

El experimento se sembró el 20 diciembre del 2018. Se utilizó un diseño de bloque al azar, en surcos de 7 m de largo X 0,60 m de ancho, en un área total de 0,033 ha, con tres repeticiones por variedad y tratamiento, con una densidad de 15-18 granos m⁻¹ ¹⁵.

Tratamientos

- T1: cultivares de frijol bajo riego (10 R)
- T2: cultivares de frijol en condiciones de sequía (5R)

En el caso del ensayo con riego se aplicaron 10 riegos considerando los requerimientos hídrico según etapas de desarrollo del frijol, con una norma neta total promedio de 3 500 m³ ha⁻¹ ¹⁵.

Variables analizadas y metodología empleadas

Se evaluaron indicadores fenológicos, de rendimiento y de productividad.

En la madurez fisiológica se cosecharon 10 plantas por tratamientos y repeticiones a las que determinaron el rendimiento en t ha⁻¹. Además, registraron los datos fenológicos de días de inicio de floración (DIF), días de madurez fisiológica (DMF) e índice reproductivo (IR) según la ecuación¹²:

$$IR (\%) = 1 - (DPR/DMF) * 100$$

Donde:

DPR = días del período reproductivo (DMF-DIF)

Al alcanzar la madurez de la cosecha se recolectaron muestras de 2 metros por surcos de cada variedad y por condición de riego, lo que equivale a un área de 2,4m² para calcular los indicadores de productividad: número de vainas por plantas, número promedio de semillas por vaina, número de semillas por plantas y el peso de cien semillas (g). Se descar-

taron los 0,5 m iniciales y finales para evitar el efecto borde y cabecera.

Para estimar la reducción del rendimiento por causa del estrés hídrico se aplicó la siguiente ecuación, Pérdida de rendimiento (PR)= 1- (Re/Rr) x100, donde:

Re= promedio general de rendimiento en sequía

Rr = promedio general de rendimiento en riego .

Para estimar la intensidad y el efecto de la sequía sobre el rendimiento, se determinó el Índice de intensidad de sequía (IIS) mediante la siguiente ecuación¹²:

IIS = [1-(RS/RRS)], donde:

RS= promedio general de rendimiento en sequía.

RRS = promedio general de rendimiento en riego.

El Índice de susceptibilidad a la sequía (ISS) para cada variedad fue determinado con la ecuación reportada por Chávez *et al.* (2018)¹³

ISSi= [1-(RSi/RRSi)]/IIS, donde:

ISSi= Índice de susceptibilidad a sequía (5 R) de la i-ésima variedad.

RSi= rendimiento promedio en sequía (5 R) de la i-ésima variedad.

RRSi= rendimiento promedio en riego suplementario (10 R) para la i-ésima variedad.

Para el cálculo de estos índices se utilizaron los valores de rendimientos obtenidos en cada repetición de sequía (5 R) con su correspondiente repetición en riego (10 R).

La comparación de las medias para el análisis de los resultados se realizó a través de la prueba de Tukey, con una probabilidad de error de 5%, mediante el programa InfoStat¹⁶.

Resultados y discusión

Al analizar el comportamiento de los indicadores fenológicos (la Tabla 1), se observan diferencias entre las variedades al comparar los resultados de las dos condiciones de riego, con un índice de intensidad de sequía de 0,24. En la condición de déficit hídrico (5R) todas las variedades adelantaron su floración, de tres a cuatro días, con respecto a su similar en condiciones óptimas de riego. La Cuba 154 y Buenaventura, fueron las que presentaron la mayor precocidad con respecto a la aparición de las flores (cuatro días antes), mientras que el resto de las variedades tuvieron sus primeras flores abiertas tres días antes.

En relación a los días a madurez fisiológica, para las plantas del tratamiento con riego oscilaron los valores entre 71 y 67 días después de la siembra; mientras que en condiciones de sequía, fue entre 61 y 90 días, por lo que todas las plantas alcanzaron más temprano la madurez de cosecha en condiciones de sequía. la variedad Delicia fue la más precoz y mantuvo el índice reproductivo (IR) mayor (Tabla1).

El índice de intensidad de sequía (IIS), indica el grado de estrés al que fueron sometidos las variedades y la idoneidad de

Variedades	DF (días)		DMF (días)		IR (%)	
	10R	5R	10R	5R	10R	5R
Delicia 364	37	34	70	63	52	53
Buenaventura	33	29	69	64	47	46
Velazco Largo	31	28	67	61	46	45
La Cuba 156	40	36	69	67	42	49
Cuba Cueto R	40	37	71	68	43	45

Tabla 1. Variables fenológicas de las variedades bajo dos condiciones de riego en CCS "Victoria de Girón", de enero a marzo 2019.

las condiciones que se tuvieron en este estudio para la identificación de las variedades con resistencia a sequía. La variación presentada en el ciclo fenológico concuerda con lo reportados por otros autores con índice semejante de 0,27¹⁷. Así como otros que reportan IIS mayores de 0,5, característico de estado de sequía terminal), quienes consideran que la precocidad en la maduración es una característica muy valiosa en la adaptación del frijol común a sequía, ya que permite completar el llenado del grano con una mayor disponibilidad de agua con respecto a genotipos más tardíos¹³. El índice reproductivo de las variedades mostró respuestas diferentes entre ellas, se pueden considerar como las más adaptadas, a las condiciones experimentales, aquellas que combinan un índice reproductivo alto y un mayor período desde la floración hasta la madurez, como son La Cuba y Cuba Cueto R, lo que favorece un período amplio para la formación de órganos reproductivos, lo que favorece la formación de granos, por lo que los resultados obtenidos indican que las variedades de frijol estudiadas poseen entre otras características, plasticidad fenológica, ya que presentar una temprana floración y madurez lo que reduce el impacto negativo del estrés así que una de las formas de escape a la sequía se basa en un rápido desarrollo fenológico^{13,18}.

Al analizar el comportamiento de los indicadores de rendimiento (peso de 100 semillas, número de vainas por plantas y número de semillas por vainas), en las dos condiciones de riego (Tabla 2), se pudo constatar que no semodificaron por igual todos los parámetros estudiados, en las condiciones de sequía (5R), en las diferentes variedades. El peso de 100 semillas fue el indicador que presentó diferencia significativa, entre las medias de las dos condiciones de riego, en todas las variedades, lo que puede explicarse por el papel determinante del déficit hídrico en la producción de vainas y llenado de las mismas¹². El número de semillas por vaina fue el que presentó menor afectación, seguido del número de vainas por plantas, que solo en la variedad Buenaventura hubo diferencia. Aunque no hubo diferencia en el número de semillas por vainas, cuando se analiza la morfología de la semilla si se aprecia diferencia (Figura 1), lo que explica la diferencia en el peso de cien semillas. Esto concuerda con lo reportado en estudio realizado, con cuatro variedades de frijol negro, cultivada en condiciones de estrés, que también las vainas presentaron granos más pequeños que las de su igual sin déficit hídrico y no hubo diferencia en el número de semillas por vainas¹⁹.

Variedades	Peso 100 Semillas (g)		Número Vainas /Plantas		Número Semillas /vainas	
	10R	5R	10R	5R	10R	5R
Delicia 364	30,62 a	26,88 b	19,2 a	18,3 a	2,91 a	2,83a
Buenaventura	32,66 a	28,42 b	14 a	11,75	3,92 a	3,38 a
Velazco Largo	42,96 a	39,41 b	6,3 a	8,3 a	3,57 a	3,49 a
Cuba Cueto rojo	28,79 a	25,33 b	15,90	14,98	6,23 a	5,83 a
La Cuba 154	34,45 a	31,66 b	15,23	14,51a	5,5 a	4,9 a

Letras diferentes indican diferencias para $p \leq 0,05$, según Test de Tukey.

Tabla 2. Indicadores de rendimiento de las variedades estudiadas bajo diferentes condiciones de riego.

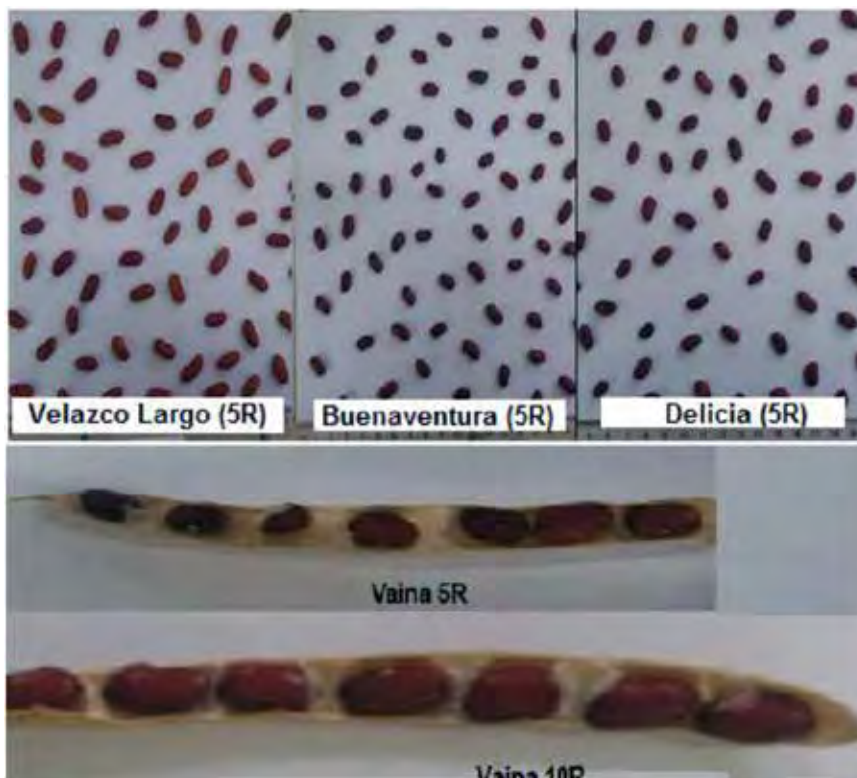


Figura 1. Ejemplo de la morfología de semillas cosechadas en condiciones de sequía (5R) y vainas en las dos condiciones de riego.

Con los resultados obtenidos de los indicadores de rendimiento, en ambas condiciones de riego, se calculó la pérdida de rendimiento (*PR*) de cada variedad (Figura 2). En general, hubo una disminución en todos los indicadores estudiados: 15,3% vainas por plantas, 14,6% de semillas por vainas, 24,9% de semillas por plantas y 17,8% en el rendimiento total. Las variedades con los mayores porcentajes de pérdida de rendimiento de número de vainas por plantas, número de semillas por vainas y número semillas por plantas, fueron Velazco Largo y Buenaventura. También la pérdida de rendimiento total, debido a la sequía, fue indudable en todas las variedades, pero fue más acentuada en las variedades Velazco Largo con 33,78% y la de menor fue Delicia con solo un 6,5%, seguido de Cuba Cueto R con 14% y La Cuba con 15% (Figura 2).

mayor que uno, lo que evidencia menor tolerancia a la sequía. Por otra parte, Buenaventura presenta un ISS menor que uno pero su índice reproductivo (*IR*) no fue alto y tuvo un 20% de pérdida del rendimiento.

Estos resultados corroboran el efecto negativo de la sequía, lo que ha sido reportado por diferentes autores. Los índices de selección utilizados permiten caracterizar el comportamiento de estos genotipos en diferentes condiciones de humedad en el suelo, aunque se sugiere la utilización combinada de por lo menos un índice de cada grupo con tal de combinar el alto potencial de rendimiento con la tolerancia a la sequía. ya que las variedades que crecieron con menos disponibilidad de agua, tuvieron menos rendimiento. No todas las variedades respondieron de igual forma, presentaron un índice

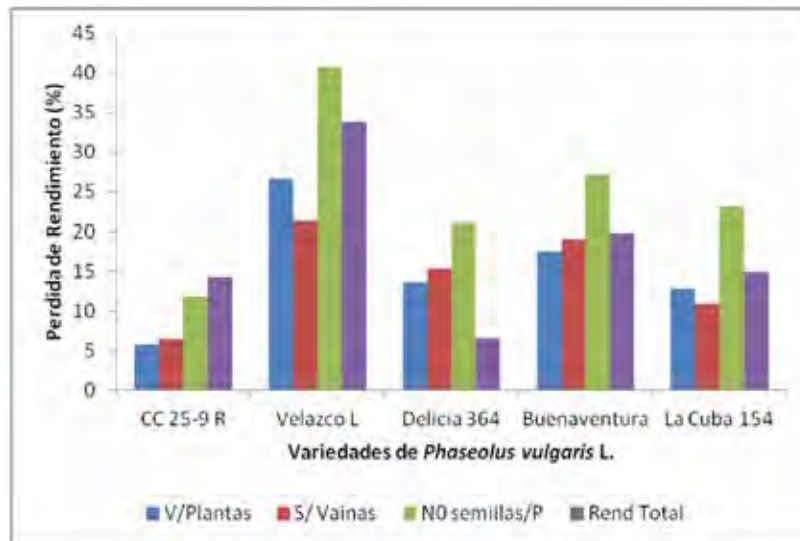


Figura 2. Porcentaje de reducción de los indicadores de rendimiento evaluados, bajo condiciones de sequía, enero-marzo 2019. Leyenda: NV/plantas: número de vainas por plantas; NS/vainas: número de semillas por vainas; NS/plantas. Número semillas por plantas y Rend Total: rendimiento total.

En trabajos realizados en campo, en condiciones de sequía experimental (cuatro riego) se reporta una disminución del rendimiento total por hectárea hasta un 48,59% en este tipo de leguminosa⁶.

También en experimento realizado con frijol Caupí se reporta disminución de 57,72%, del rendimiento de grano por planta, 49,40%, del número de vainas por planta, 32,07% del número de semillas por vaina⁷.

Los resultados de índices de susceptibilidad a la sequía (ISS) para los genotipos estudiados estuvieron entre 0,27 y 1,77 (Tabla 3).

Las variedades Delicia, Cuba Cueto R y La Cuba 154 presentaron una menor reducción del rendimiento, simultáneamente a un menor índice de susceptibilidad a la sequía (ISS), lo que expresa una mayor tolerancia al déficit hídrico. Sin embargo, Velazco Largo disminuyó su rendimiento y presentó un ISS

de estrés que varía en correspondencia a la tolerancia a la sequía que caracteriza a la variedad^{5,11,13}.

La respuesta de las plantas a este estrés ambiental depende de varios factores incluyendo el genotipo, la etapa del desarrollo de la planta, la longitud y la severidad del estrés aplicado^{11,12}. Por otra parte, las características del suelo pueden influir en dichos resultados, de ahí la importancia de evaluar el comportamiento productivo de las variedades en cada localidad¹⁴.

Como consecuencia de los cambios climáticos los períodos de sequía dentro del ciclo de cultivo del frijol cada vez es más son más intensos. Debido a esta razón, es importante enfocar el mejoramiento del cultivo por resistencia a sequía hacia genotipos que tengan rendimientos altos, tanto en una condición de estrés como cuando no la haya. Bajo este precepto las variedades La Cuba y Cuba Cueto R fueron las mejores, con

Variedades	Rendimiento (t ha ⁻¹)		ISS	Respuesta a la sequía
	10R	5R		
Delicia	0,86 a	0,81a	0,66	Tolerante
Buenaventura	0,99 a	0,79 b	0,97	Medianamente Tolerante
La Cuba 154	1,9 a	1,61ab	0,27	Tolerante
Velazco L.	1,16 a	0,77 b	1,77	Menos Tolerante
Cuba Cueto R	1,9 a	1,63 ab	0,83	Tolerante

Letras diferentes indican diferencias para p ≤ 0,05, según Test de Tukey.

Tabla 3. Respuesta de las variedades a la sequía según su rendimiento e ISS.

excelentes rendimientos en ambos ambientes y que podrían representar una solución para las zonas propensas a sufrir sequía o para tener en cuenta a la hora de sembrar en el periodo poco lluvioso (enero-marzo). También la variedad Delicia, aunque no tuvo alto rendimiento en ninguna de las dos condiciones pero entre ellas no hubo diferencia.

El índice de susceptibilidad a la sequía (ISS) puede ser considerado como un criterio aceptable para discriminar variedades, bajo condiciones de estrés hídrico. No obstante, se deben tener en cuenta otras características; ya que puede darse el caso que las variedades con mayor tolerancia a la sequía (menor ISS), no necesariamente sean las más productoras en esas condiciones, pero si los que menos reducen su rendimiento^{5,17}.

Conclusiones

Las variedades Cuba Cueto 25-9 colorado, La Cuba 154 y Delicia 364 presentaron los índices de intensidad de sequía (ISS) menores a 1, por lo que se consideran como tolerantes a la sequía, recomendándose su empleo en la localidad analizada y en la época de siembra que se corresponde con los periodos poco lluviosos en Cuba.

La variedad Velazco Largo es la más afectada por la sequía lo que se corresponde con su ISS y su rendimiento, por lo tanto, para la localidades en condiciones de secano no se recomienda su cultivo en época de siembra de pocas lluvias.

El déficit hídrico a pesar de que no afectó el número de vainas por planta y de semillas por vaina, sí afectó la morfología y peso de las semillas.

Referencias bibliográficas

1. Hernández, J.C.; Chaves, N.F.; Arayar, Y.; Beebe, S. Diquís, variedad de frijol común rojo brillante. *Agronomía Costarricense*. 2018; 42(1): 127-136. ISSN 0377-9424.
2. FAO (Organización Mundial de la Alimentación). El futuro de la alimentación y la agricultura. Tendencias y Desafíos (2017). Disponible: <www.fao.org/3/a-i6583e> [Consultado: 16 de marzo 2020].
3. Martirena-Ramírez, A.; Veitía, N.; García, L.R.; Collado, R.; Torres, D.; Rivero Quintana, L.; Ramírez-López, M. Caracterización morfológica de líneas de *Phaseolus vulgaris* L. en casa de cultivo. *Biología Vegetal*. 2017;17(3):191-20
4. Polanía, J.A.; Rao, I.M.; Mejía, S.; Beebe, S.E.; Cajiao, C. Características morfológicas del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) relacionadas con la adaptación a sequía. *Acta Agron.* 2012; 61(3): 197-206.
5. Estrada, W.; Chávez, L.; Jerez, E.; Nápoles, M.C.; Sosa, A.; Maceo Y.C.; Cordoví, C. Respuesta de cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a la sequía utilizando diferentes índices de selección. *Cultivos tropicales*. 2016; 37(3):79-84. DOI: 10.13140/RG.2.1.5181.2082
6. Domínguez, A.; Darias, R.; Martínez, Y.; Alfonso, E. Tolerancia al déficit hídrico de variedades de frijol común en condiciones de sequía experimental, en campo. *Revista Centro Agrícola*. 2019a; 46(3): 22-29. ISSN: 0253-5785 ISSN on line: 2072-2001.

7. Cardona, C., Jarma A.J.; Araméndiz, H.; Peña, M.; Vergara, C. Respuesta fisiológicas y bioquímicas del frijol caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) bajo déficit hídrico". *Rev. Colomb. Cienc. Hortic.* 2014; 8(2):250-261.
8. Martirena-Ramírez, A.; Veitía, N.; García, L.R.; Collado, R.; Torres, D.; Rivero- Quintana, L.; Ramírez- López, M. Respuesta de líneas de *Phaseolus vulgaris* L. en época de siembra tardía. *Biología Vegetal*. 2018; 18(2): 117-123.
9. Domínguez, A.; Pérez, Y.; Alemán, S.; Sosa, M.; Fuentes, L.; Darias, R. (et al). Respuesta de cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. al estrés por sequía. *Biología Vegetal*. 2014; 14 (1): 29 – 36. ISSN 2074-864.
10. Polón-Pérez, R.; Ruiz-Sánchez, M.; Miranda-Caballero, A.; Ramírez-Arrebató, M.A. Efectos del estrés hídrico sobre el rendimiento de los granos del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 2017; 26(1): 66-70). ISSN -1010-2760, E-ISSN: 2071-0054.
11. Polón, R.; Miranda, A.; Ramírez, M.A.; López, L.A. Efectos del estrés de agua sobre el rendimiento de granos en la fase vegetativa en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 2014; 23: 4. ISSN -1010-2760, RNP5-0111.
12. Boicet, T.; Secada, Y.; Chaveco, O.; Boudet, A.; Gómez, Y.; Meriño, Y. (et al). Respuesta a la sequía de genotipos de frijol común utilizando diferentes índices de selección. *Centro Agrícola*. 2011; 38(4): 69-73.
13. Chaves-Barrantes N.F.; Polanía J, A.; Muñoz-Perea C.G.; Rao I.M.; Beebe, S.E. Caracterización fenotípica por resistencia a sequía terminal de germoplasma de frijol común. *Agron. Mesoam.* 2018; 29(1):1-17. ISSN 2215-3608. doi:10.15517/ma.v29i1. 27618.
14. Hernández, A.; Pérez, J.M.; Bosch, D.; Castro, N. Clasificación de los suelos de Cuba. Publicado en formato digital. Ediciones INCA. La Habana, Cuba. 2015; 53-57. ISBN: 978-959-7023-77-7
15. Faure, B.; Benitez, R.J.; León, N.; Chaveco, O.; Rodríguez, O. Guía técnica para el cultivo del frijol común (*Phaseolus Vulgaris* L.). Instituto de Investigaciones de Grano. Editora Agroecológica. La Habana, 2012.
16. Di Rienzo, J.A.; Balzarini, M.; Casanoves, F.; González, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. InfoStat/ profesional versión 1.1.; 2011. Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba.
17. Meriño, H.Y.; Boudet, A.A.; Boicet, F.T.; Amado, B.E.; Palacio, A.J.; Castillo, R.O. "Rendimiento y tolerancia a la sequía de seis variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de campo". *Centro Agrícola*. 2015; 42(1): 69–74, ISSN: 2072-2001.
18. Pedroza-Sandoval, A.; Trejo-Calzada, R.; Sánchez-Cohen, I.; Samaniego-Gaxiola, J.A., Yáñez-Chávez, L.G. Evaluación de tres variedades de frijol pinto bajo riego y sequía en Durango, México. *Agronomía Mesoamericana*. 2016; 27(1):167–76. doi:10.15517/am. v27i1.21896.
19. Domínguez, A.; Darias, R.; Martínez, Y.; Bello, A.. Comportamiento productivo de variedades de frijol (negro) en condiciones de sequía en CCS Sabino Pupo. *Revista Avanzada Científica*. 2019b; 22(2):18-28. ISSN 1029-3450.

Received: 10 Octubre 2020

Accepted: 7 enero 2021

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Remoción de cinco productos farmacéuticos catalogados como contaminantes emergentes en medio acuoso utilizando la especie vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) Removal of five pharmaceutical products classified as emerging pollutants in aqueous medium using the vetiver species (*Chrysopogon zizanioides*)

Checa-Artos Miriam¹, Sosa del Castillo Daynet¹, Vanegas María Eulalia³, Ruiz-Barzola Omar^{1,2}, Barcos-Arias Milton^{1*}

DOI. [10.21931/RB/2021.06.01.7](https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.01.7)

Resumen: Los productos farmacéuticos constituyen un grupo único de contaminantes emergentes de gran interés, debido a que se ha determinado su presencia frecuente en aguas superficiales, subterráneas y agua potable. Debido al metabolismo y la absorción incompletos en el organismo humano, una cantidad significativa de estos fármacos se excretan y liberan al ambiente a través de las aguas residuales. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial de la especie vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) para eliminar del medio acuoso cinco productos farmacéuticos comúnmente recetados y de venta libre como ciprofloxacina, ibuprofeno, sulfametaxazol, diclofenaco y acetaminofén. La especie fue aclimatada en invernadero, donde se llevó a cabo los experimentos en condiciones controladas de temperatura y a un pH de 6,5. Las muestras fueron analizadas utilizando espectrofotometría UV-Vis para leer en forma directa las absorbancias de cada producto farmacéutico. Para el análisis estadístico de los datos se empleó la metodología de superficies de respuesta con el fin de encontrar los modelos que ayuden a determinar tiempos y concentraciones óptimas donde se maximiza la absorción de cada fármaco, así como la obtención de las pendientes de crecimiento para determinar hacia donde se deberá buscar el óptimo. Se utilizó el software estadístico R versión 3.6.0 y RStudio versión 1.1.453. Los resultados obtenidos indican que *C. zizanioides* removió de manera más eficiente ciprofloxacina (98,3%) a una concentración de 3mg/L en un tiempo de 149h, seguido por ibuprofeno y diclofenaco con un máximo de remoción de 73,33% y sulfametaxazol con 66,53%, obteniéndose el menor porcentaje de remoción para acetaminofén de 38,49% a las 192h, donde se realizó toma de muestras cada 48 horas de las soluciones de cada fármaco a diferentes concentraciones (3 mg/L, 6 mg/L, 9 mg/L, 12 mg/L). En este trabajo de investigación se demostró la capacidad removedora de *Chrysopogon zizanioides* de los cinco fármacos estudiados en medio acuoso en condiciones controladas, vislumbrando un gran potencial en el ámbito de la biotecnología ambiental para el tratamiento terciario de aguas residuales.

Palabras clave: Productos farmacéuticos, contaminantes emergentes, aguas residuales, vetiver (*Chrysopogon zizanioides*), fitorremediación, superficie de respuesta.

Abstract: Pharmaceutical products constitute a unique group of emerging pollutants of great interest because their frequent presence in surface waters, groundwater, and drinking water have been determined. Due to incomplete metabolism and absorption in the human body, many of these drugs are excreted and released to the environment through wastewater. Therefore, this work's objective was to evaluate the potential of the vetiver species (*Chrysopogon zizanioides*) to eliminate five commonly prescribed and over-the-counter pharmaceuticals from the aquatic environment, such as ciprofloxacin, ibuprofen, sulfamethoxazole, diclofenac, and acetaminophen. The species was acclimated in wintering to carry out the experiments under standard temperature conditions and a pH of 6.5. The samples were analyzed using UV-Vis spectrophotometry to read the absorbances of each pharmaceutical product directly. For the statistical analysis of the data, the response surfaces methodology was used to find the models that help determine optimal times and concentrations where the absorption of each drug is maximized and obtain the growth slopes to determine where the optimum should be sought. Statistical software R version 3.6.0 and RStudio version 1.1.453 were used. The results obtained indicate that *C. zizanioides* more efficiently removed ciprofloxacin (98.3%) at a concentration of 3mg/L over a time of 149h, followed by ibuprofen and diclofenac with a maximum removal of 73.33% and sulfamethazole with 66.53%, obtaining the lowest percentage of removal for acetaminophen of 38.49% at 192h, where samples were taken every 48 hours of the solutions of each drug at different concentrations (3 mg/L, 6 mg/L, 9 mg/L, 12 mg/L). In this research work, the removal capacity of *Chrysopogon zizanioides* of the five drugs studied in an aqueous medium under controlled conditions was demonstrated, envisaging great potential in the field of environmental biotechnology for tertiary wastewater treatment.

Key words: Pharmaceuticals products, emerging pollutants, wastewater, vetiver (*Chrysopogon zizanioides*), phytoremediation, response surface.

Introducción

Los contaminantes emergentes (CE) son compuestos que actualmente no están incluidos en las regulaciones de calidad del agua, sin embargo, presentan amenazas potenciales para los ecosistemas acuáticos, la salud y la seguridad huma-

na. Abarcan un grupo diversos de compuestos que incluyen a productos farmacéuticos (PFs), drogas de abuso, productos de cuidado personal (PCP), esteroides y hormonas, tensioactivos, compuestos per fluorados (PFC), llama retardantes, aditivos

¹ Universidad Peruana Unión, Escuela Profesional de Medicina Humana, Laboratorio de Investigación en Biología Molecular, Perú.

² Universidad San Martín de Porres, Facultad de Medicina Humana, Centro de Investigación de Medicina Tradicional y Farmacología, Perú.

³ Centro de Estudios Ambientales, Departamento de Química Aplicada y Sistemas de Producción, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.

industriales y agentes aditivos de gasolina, así como sus productos de transformación, nanomateriales, 1,4-dioxano y subproductos de desinfección de piscinas (DBP)^{1,2,3}.

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

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

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

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

Los PFs más prescritos en medicina humana son los analgésicos antiinflamatorios como el ibuprofeno y el diclofenaco, los antiepilépticos como la carbamazepina, antibióticos como la amoxicilina y el sulfametoxazol, y los bloqueantes como el metoprolol, además de los fármacos cada vez más utilizados en veterinaria, acuicultura, ganadería y avicultura¹⁷.

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

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

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

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

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

Existen estudios alrededor del planeta, que han detectado la presencia de contaminantes emergentes a la entrada y salida de las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales, lo que presupone que no están diseñadas para el tratamiento de este tipo de contaminantes. En un estudio realizado en Algeria, se reportó la presencia de ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco en aguas superficiales; ibuprofeno y

ketofreno en agua de grifo, confirmando la incapacidad de una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) clásica para eliminar estos contaminantes²².

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

Según (24), las características de la calidad del agua y los contaminantes orgánicos emergentes fueron muestreados en Ecuador, a lo largo de los ríos San Pedro – Guayllabamba – Esmeraldas y sus principales afluentes en el verano de 2013. Los principales compuestos detectados fueron venlafaxina, carbamazepina, sulfametoxazol y benzoilcgonina. El estudio permitió relacionar el consumo de fármacos en una de las principales ciudades (Quito) de América Latina y permitió mostrar que el consumo de la mayoría de las drogas muestreadas (carbamazepina, venlafaxina, O-des metil venlafaxina, sulfametoxazol, etinilestradiol) estuvo por debajo de su nivel de consumo promedio en Europa, Israel y América del Norte²⁴.

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

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

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

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

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

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

La selección de la especie vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) para la presente investigación, se basó en el alto número de reportes científicos que denotan la efectividad que tiene esta especie removiendo diferentes tipos de contaminantes como metales pesados y algunos contaminantes orgánicos,

indicando que estas técnicas son rentables en comparación con otros métodos^{40,43,44}.

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

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

Materiales y métodos

Recolección y acondicionamiento de la especie vetiver (*Chrysopogon zizanioides*)

Las plántulas de la especie vetiver (*Chrysopogon zizanioides*), fueron recolectadas y sembradas en un vivero ubicado en la ciudad de Milagro, provincia del Guayas por un tiempo aproximado de dos meses y luego fueron llevadas al invernadero del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), en donde se las dispuso en terrenos aledaños al invernadero durante aproximadamente 30 días. Posteriormente se realizó un lavado a fondo para eliminar todo el suelo e impurezas de la zona radicular y se procedió a transferir las plantas a canastillas rectangulares de 25 litros de capacidad para ser

aclimatadas en agua durante 20 días, previo a su uso en los experimentos de fitorremediación de los productos farmacéuticos en estudio. Este es un proceso adaptado en base a lo establecido por (48).

Diseño del experimento

Se estudiaron cinco PFs de manera independiente: sulfametoxazol, ciprofloxacina, acetaminofén, ibuprofeno y diclofenaco todos de la marca SIGMA-ALDRICH de 99,9 % de pureza. De cada fármaco se prepararon soluciones acuosas utilizando metanol ultrapuro de la marca Merck a cuatro concentraciones: 3 mg/L, 6 mg/L, 9 mg/L, 12 mg/L. Se utilizaron 4 tiempos de muestreo 48 h, 96 h, 144 h y 192 h, para obtener la variable de respuesta que es el porcentaje de remoción.

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

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

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

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

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

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

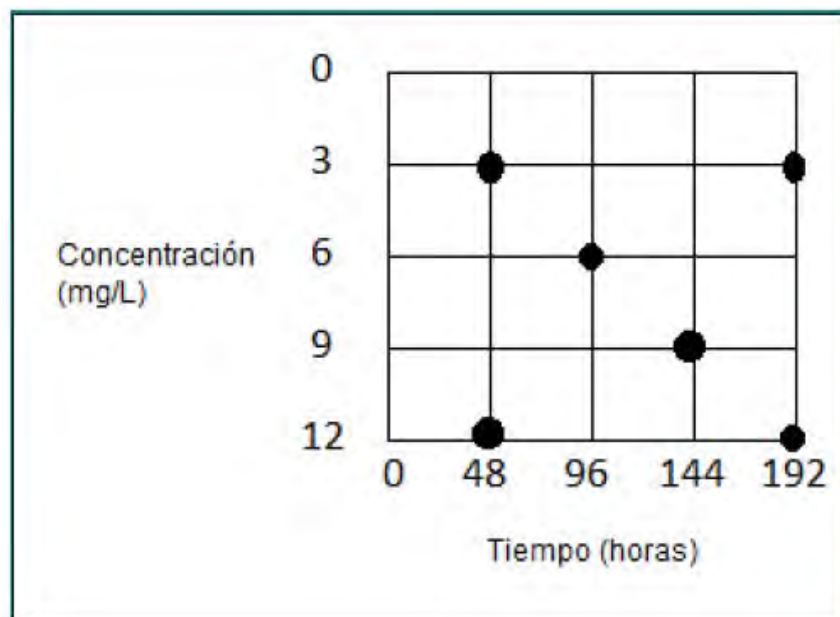


Figura 1. Esquema del diseño experimental utilizado.

Análisis de Datos

Para el análisis estadístico de los datos se empleó la técnica de superficies de respuesta para encontrar los modelos que ayuden a determinar tiempos y concentraciones óptimas donde se maximiza la absorción de cada fármaco, así como la obtención de las pendientes de crecimiento para determinar hacia donde se deberá buscar el óptimo, en los casos donde no se los encontró. Se utilizó el software estadístico R versión 3.6.0 y RStudio versión 1.1.453.

Resultados

Modelo General

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

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

Donde,

Y= porcentaje de remoción

b₀= intercepto

b_i= coeficientes del modelo

C Concentración

T Tiempo

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

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

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

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

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

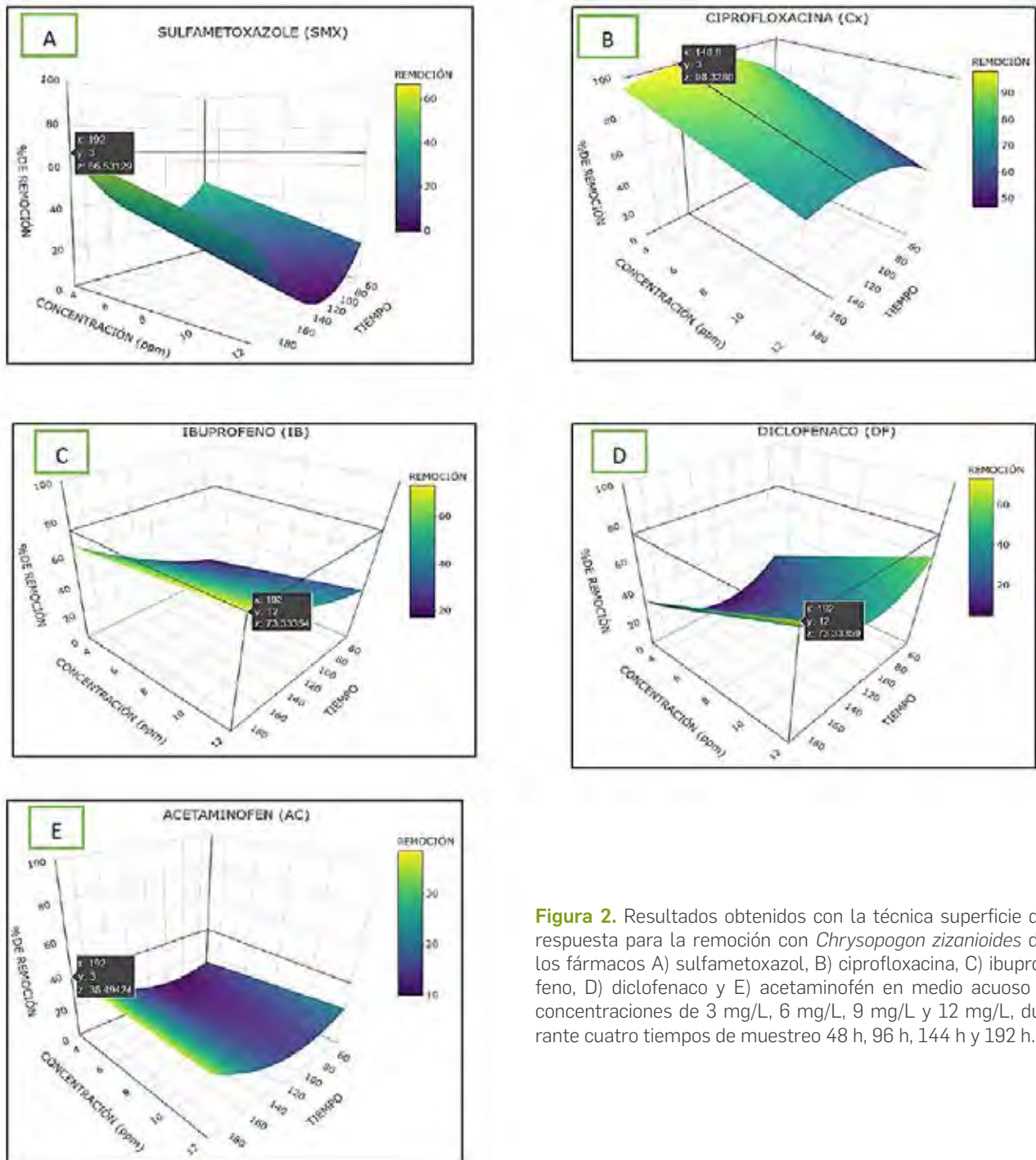


Figura 2. Resultados obtenidos con la técnica superficie de respuesta para la remoción con *Chrysopogon zizanioides* de los fármacos A) sulfametoxazol, B) ciprofloxacina, C) ibuprofeno, D) diclofenaco y E) acetaminofén en medio acuoso a concentraciones de 3 mg/L, 6 mg/L, 9 mg/L y 12 mg/L, durante cuatro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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Discusión

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

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

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

Al analizar las muestras correspondientes a la ciprofloxacina se obtuvieron valores óptimos del 98.32% a las 149 h (Figura 2B) con una concentración de 3 mg/L, estos resultados son similares a un estudio donde se alcanzó una remoción del 97.0% de ciprofloxacina en un periodo experimental de 30 días, en plantas expuestas a 0,05 y 0,1 mg/L de este antibiótico, y 80.0% y 85.0% de remoción respectivamente al ser expuestas a soluciones con concentraciones de 1 a 10 mg/L de ciprofloxacina⁴¹.

Los ensayos realizados con ibuprofeno para evidenciar la capacidad de *Chrysopogon zizanioides* como agente de fitorremediación de este fármaco, arrojaron resultados favorables con un porcentaje de remoción máximo de 73.33% a las 192

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

En este estudio se logró un porcentaje máximo de remoción del 73.33% del diclofenaco a las 192 h (Figura 2D), los valores máximos obtenidos en este estudio resultan semejantes a otros reportes donde se usaron especies vegetales para determinar sus capacidades de absorción del diclofenaco, como es el caso de la especie *Typha latifolia* que fue el objeto de estudio de (51), quienes demostraron que dicha especie es capaz de absorber un máximo del 80.0% del diclofenaco presente en una concentración de 1mg/L.

Por otra parte, el acetaminofén arrojó valores máximos de 38.49% a las 192 h (Figura 2E) a una concentración de 3mg/L, siendo este valor de remoción el menor registrado entre los cinco fármacos analizados en este trabajo de investigación. Varias pueden ser las razones de la baja remoción, incluyendo las características del fármaco y su compatibilidad con la estructura de la especie vegetal evaluada. En un estudio usando *Brassica juncea*, el porcentaje de remoción para el acetaminofén alcanzó el 60.0% en 165 h a una concentración de 1 mM que corresponde aproximadamente a 150mg/L⁵².

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

En comparación con otras plantas, *Chrysopogon zizanioides* es más eficiente en la absorción de ciertos metales pesados y productos químicos debido a la capacidad de su sistema de raíces para alcanzar mayores profundidades y volumen. Asimismo, se descubrió que esta planta es altamente tolerante en condiciones extremadamente adversas, por lo tanto, se puede utilizar para la rehabilitación de relaves mineros, vertederos de basura y vertederos de desechos industriales que a menudo son extremadamente ácidos o alcalinos, ricos en metales pesados y bajos en nutrientes para las plantas⁴³. Adicionalmente, sostienen que las plantas pueden limpiar muchos tipos de contaminantes como metales, pesticidas, aceites y explosivos³⁷.

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

Los resultados obtenidos en este estudio reflejan la eficiencia del vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) en la remoción de los cinco fármacos del estudio, lo que demuestra que la técnica de fitorremediación funciona eficientemente bajo condiciones controlada (invernadero) y pudiera ser prometedora a

mayor escala, lo cual fue probado en 1995 en Queensland, Australia, donde este pasto, fue reconocido por primera vez por tener características "súper absorbentes" adecuadas para la eliminación de lixiviados y efluentes generados en vertederos y plantas de tratamiento de aguas residuales, lo mismo fue corroborado por científicos chinos en 1997 y desde entonces el denominado Sistema Vetiver se ha utilizado con éxito para estos fines en Australia, China y Tailandia^{44,47}. Vetiver atrajo la atención mundial como un medio natural para diversas aplicaciones ambientales, incluyendo la desintoxicación de suelos y agua contaminados⁴⁶.

Conclusiones

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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgments

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas de la Escuela Superior Politécnica del Litoral por haber facilitado las instalaciones del invernadero y sus laboratorios para el desarrollo de los experimentos. Y al Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca por haber permitido la utilización de sus instalaciones y equipos del laboratorio para el análisis de muestras.

Referencias bibliográficas

1. Farré, M. la, Pérez, S., Kantiani, L. & Barceló, D. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 27, 991-1007 (2008).

2. Hossain, A. et al. Occurrence and ecological risk of pharmaceuticals in river surface water of Bangladesh. *Environ. Res.* 165, 258-266 (2018).
3. Ebele, A. J., Abou-Elwafa Abdallah, M. & Harrad, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerg. Contam.* 3, 1-16 (2017).
4. Peña-Guzmán, C. et al. Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. *J. Environ. Manage.* 237, 408-423 (2019).
5. Gogoi, A. et al. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundw. Sustain. Dev.* 6, 169-180 (2018).
6. Fang, W., Peng, Y., Muir, D., Lin, J. & Zhang, X. A critical review of synthetic chemicals in surface waters of the US, the EU and China. *Environ. Int.* 131, 104994 (2019).
7. Paíga, P. et al. Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation. *Sci. Total Environ.* 573, 164-177 (2016).
8. Kibuye, F. A. et al. Fate of pharmaceuticals in a spray-irrigation system: From wastewater to groundwater. *Sci. Total Environ.* 654, 197-208 (2019).
9. Fekadu, S., Alemayehu, E., Dewil, R. & Van der Bruggen, B. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. *Sci. Total Environ.* 654, 324-337 (2019).
10. Gamarra, J. S., Godoi, A. F. L., de Vasconcelos, E. C., de Souza, K. M. T. & Ribas de Oliveira, C. M. Environmental Risk Assessment (ERA) of diclofenac and ibuprofen: A public health perspective. *Chemosphere* 120, 462-469 (2015).
11. Balakrishna, K., Rath, A., Praveenkumarreddy, Y., Guruge, K. S. & Subedi, B. A review of the occurrence of pharmaceuticals and personal care products in Indian water bodies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 137, 113-120 (2017).
12. Alidina, M. et al. The occurrence of emerging trace organic chemicals in wastewater effluents in Saudi Arabia. *Sci. Total Environ.* 478, 152-162 (2014).
13. Batt, A. L., Furlong, E. T., Mash, H. E., Glassmeyer, S. T. & Kolpin, D. W. The importance of quality control in validating concentrations of contaminants of emerging concern in source and treated drinking water samples. *Sci. Total Environ.* 579, 1618-1628 (2017).
14. Zhang, S., Gitungo, S., Axe, L., Dyksen, J. E. & Raczko, R. F. A pilot plant study using conventional and advanced water treatment processes: Evaluating removal efficiency of indicator compounds representative of pharmaceuticals and personal care products. *Water Res.* 105, 85-96 (2016).
15. Rigobello, E. S., Dantas, A. D. B., Di Bernardo, L. & Vieira, E. M. Removal of diclofenac by conventional drinking water treatment processes and granular activated carbon filtration. *Chemosphere* 92, 184-191 (2013).
16. Afonso-Olivares, C., Sosa-Ferrera, Z. & Santana-Rodríguez, J. J. Occurrence and environmental impact of pharmaceutical residues from conventional and natural wastewater treatment plants in Gran Canaria (Spain). *Sci. Total Environ.* 599-600, (2017).
17. Shikha, S. & Gauba, P. Phytoremediation of Industrial and Pharmaceutical Pollutants. *Recent Adv. Biol. Med.* 02, 113 (2016).
18. Szekeres, E. et al. Investigating antibiotics, antibiotic resistance genes, and microbial contaminants in groundwater in relation to the proximity of urban areas. *Environ. Pollut.* 236, 734-744 (2018).
19. Miller, E. L., Nason, S. L., Karthikeyan, K. G. & Pedersen, J. A. Root Uptake of Pharmaceuticals and Personal Care Product Ingredients. *Environmental Science and Technology* 50, (2016).
20. Küster, A. & Adler, N. Pharmaceuticals in the environment: Scientific evidence of risks and its regulation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, (2014).
21. Liu, J. L. & Wong, M. H. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review on environmental contamination in China. *Environ. Int.* 59, 208-224 (2013).
22. Kermia, A. E. B., Fouial-Djebbar, D. & Trari, M. Occurrence, fate and removal efficiencies of pharmaceuticals in wastewater treatment plants (WWTPs) discharging in the coastal environment of Algiers. *Comptes Rendus Chim.* 19, 963-970 (2016).

23. Sharma, B. M. et al. Health and ecological risk assessment of emerging contaminants (pharmaceuticals, personal care products, and artificial sweeteners) in surface and groundwater (drinking water) in the Ganges River Basin, India. *Sci. Total Environ.* 646, 1459–1467 (2019).
24. Voloshenko-Rossin, A. et al. Emerging pollutants in the Esmeraldas watershed in Ecuador: Discharge and attenuation of emerging organic pollutants along the San Pedro-Guayllabamba-Esmeraldas rivers. *Environ. Sci. Process. Impacts* 17, 41–53 (2015).
25. Brausch, J. M., Connors, K. A., Brooks, B. W. & Rand, G. M. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 218. 218, (2012).
26. Lai, W. W. P., Lin, Y. C., Tung, H. H., Lo, S. L. & Lin, A. Y. C. Occurrence of pharmaceuticals and perfluorinated compounds and evaluation of the availability of reclaimed water in Kinmen. *Emerg. Contam.* 2, 135–144 (2016).
27. Sui, Q. et al. Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review. *Emerg. Contam.* 1, 14–24 (2015).
28. Jiang, Y. et al. Occurrence, seasonal variation and risk assessment of antibiotics in Qingcaosha reservoir. *Water (Switzerland)* 10, (2018).
29. Li, W., Shi, Y., Gao, L., Liu, J. & Cai, Y. Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. *Chemosphere* 89, 1307–1315 (2012).
30. Shraim, A. et al. Analysis of some pharmaceuticals in municipal wastewater of Almadinah Almunawarah. *Arab. J. Chem.* 10, S719–S729 (2017).
31. Guerra, P., Kim, M., Shah, A., Alaei, M. & Smyth, S. A. Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/anti-inflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes. *Sci. Total Environ.* 473–474, 235–243 (2014).
32. Semerjian, L., Shanableh, A., Semreen, M. H. & Samarai, M. Human health risk assessment of pharmaceuticals in treated wastewater reused for non-potable applications in Sharjah, United Arab Emirates. *Environ. Int.* 121, 325–331 (2018).
33. KwarciaK-Kozłowska, A. Removal of pharmaceuticals and personal care products by ozonation, advance oxidation processes, and membrane separation. *Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/b978-0-12-816189-0.00007-x
34. Rivera-Jaimes, J. A. et al. Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 613–614, 1263–1274 (2018).
35. Lin, H. et al. Mass loading and emission of thirty-seven pharmaceuticals in a typical municipal wastewater treatment plant in Hunan Province, Southern China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147, 530–536 (2018).
36. Kalia, V. C. Pharmaceutical and personal care product contamination: a global scenario. *Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/b978-0-12-816189-0.00002-0
37. Rasheed, T., Bilal, M., Nabeel, F., Adeel, M. & Iqbal, H. M. N. Environmentally-related contaminants of high concern: Potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment. *Environ. Int.* 122, 52–66 (2019).
38. Yang, Y., Ok, Y. S., Kim, K. H., Kwon, E. E. & Tsang, Y. F. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Science of the Total Environment* 596–597, (2017).
39. Bai, X. et al. Occurrence, distribution, and seasonality of emerging contaminants in urban watersheds. *Chemosphere* 200, (2018).
40. Paz-Alberto, A. M. & Sigua, G. C. Phytoremediation: A Green Technology to Remove Environmental Pollutants. *Am. J. Clim. Chang.* 02, 71–86 (2013).
41. Panja, S., Sarkar, D., Li, K. & Datta, R. Uptake and transformation of ciprofloxacin by vetiver grass (*Chrysopogon zizanioides*). *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 142, 200–210 (2019).
42. Mishra, S. & Maiti, A. The efficiency of *Eichhornia crassipes* in the removal of organic and inorganic pollutants from wastewater: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 7921–7937 (2017).
43. Suelee, A. L., Hasan, S. N. M. S., Kusin, F. M., Yusuff, F. M. & Ibrahim, Z. Z. Phytoremediation Potential of Vetiver Grass (*Vetiveria zizanioides*) for Treatment of Metal-Contaminated Water. *Water. Air. Soil Pollut.* 228, (2017).
44. Maharjan, A. & Pradhanang, S. Potential of Vetiver Grass for Wastewater Treatment. *Environ. Ecol. Res.* 5, 489–494 (2017).
45. Kiiskila, J. D., Sarkar, D., Panja, S., Sahi, S. V. & Datta, R. Remediation of acid mine drainage-impacted water by vetiver grass (*Chrysopogon zizanioides*): A multiscale long-term study. *Ecol. Eng.* 129, 97–108 (2019).
46. Kiiskila, J. D., Li, K., Sarkar, D. & Datta, R. Metabolic response of vetiver grass (*Chrysopogon zizanioides*) to acid mine drainage. *Chemosphere* 240, 124961 (2020).
47. Panja, S., Sarkar, D. & Datta, R. Vetiver grass (*Chrysopogon zizanioides*) is capable of removing insensitive high explosives from munition industry wastewater. *Chemosphere* 209, 920–927 (2018).
48. Datta, R. et al. Phytoremediation Potential of Vetiver Grass [*Chrysopogon zizanioides* (L.)] for Tetracycline. *Int. J. Phytoremediation* 15, 343–351 (2013).
49. Chen, H. R. et al. Assessment of veterinary drugs in plants using pharmacokinetic approaches: The absorption, distribution and elimination of tetracycline and sulfamethoxazole in ephemeral vegetables. *PLoS One* 12, 1–16 (2017).
50. He, Y. et al. Metabolism of Ibuprofen by *Phragmites australis*: Uptake and Phytodegradation. *Environ. Sci. Technol.* 51, 4576–4584 (2017).
51. Bartha, B., Huber, C. & Schröder, P. Uptake and metabolism of diclofenac in *Typha latifolia* - How plants cope with human pharmaceutical pollution. *Plant Sci.* 227, 12–20 (2014).
52. Bartha, B., Huber, C., Harpaintner, R. & Schröder, P. Effects of acetaminophen in *Brassica juncea* L. Czern.: Investigation of uptake, translocation, detoxification, and the induced defense pathways. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 1553–1562 (2010).
53. Roongtanakiat, N. & Akharawutchayanon, T. Evaluation of vetiver grass for radiocesium absorption ability. *Agric. Nat. Resour.* (2017). doi:10.1016/j.anres.2017.01.002
54. Banerjee, R., Goswami, P., Lavania, S., Mukherjee, A. & Lavania, U. C. Vetiver grass is a potential candidate for phytoremediation of iron ore mine spoil dumps. *Ecol. Eng.* 132, 120–136 (2019).

Received: 5 October 2020

Accepted: 15 November 2020

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Phytochemical screening and antioxidant activity of *Epidendrum nocturnum*

Fernando Mencias, Telmo Salazar, Marco Cerna

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.8

Abstract: The objective of this study was to evaluate the antioxidant capacity of *Epidendrum nocturnum* using the DPPH technique to determine the capacity for scavenging free radicals, as well as to identify secondary metabolites in ethanolic extracts of the previously mentioned species by phytochemical screening, with analysis of alkaloids, flavonoids, saponins, tannins, and triterpenes. The results determined in the phytochemical screening that the secondary metabolites were most present were flavonoids, tannins, and saponins; no alkaloids or triterpenes were found. In the analysis of antioxidant activity, *Epidendrum nocturnum* in the three extracts showed that with an average concentration of 3.50 ppm, it could inhibit 50% of the free radicals present in the test solution.

Key words: Antioxidant, *Epidendrum*, DPPH, metabolites, screening.

Introduction

Orchids belong to the Orchidaceae family, one of the most numerous families with approximately 35,000 species and striking for their beautiful flowers¹. In Ecuador, Endara and Jost² mention that there are 1707 endemic orchid species, and because of this, it is said that this family is considered the most diverse of vascular plants.

We will find several secondary metabolites within the orchids such as alkaloids, flavonoids, phenols, terpenoids, and phenanthrenes; these being complex substances used as active principles in the pharmaceutical industry, they have a pharmacological or physiological action on the body³.

Within the scientific field, interest in verifying the ethnobotanical uses of plants, or obtaining new compounds with pharmacological activity, especially with antioxidant action. Because Ecuador has a great diversity of orchids used in traditional medicine that still do not have a phytochemical screening, the lack of scientific studies that corroborate these applications is evident; with those mentioned above, it is essential since active principles can be obtained to replace synthetic compounds used in the pharmaceutical industry⁴.

Materials and methods

Location and collection of the sample

The collection was carried out in the "Orquideario de Sarina," located in the province of Pichincha, in the canton of Quito, in the parish of El Quinche.

The plant material selected for this study was 100g of leaves; the leaves were cut with pruning scissors previously sterilized with 96% alcohol, placed in paper bags, and stored in plastic bags with a seam to avoid deterioration the samples.

Obtaining the ethanolic extract

To obtain the ethanolic extracts, a maceration was carried out according to the methodology described by Moreno and Jaramillo⁵, the process consisted of: taking 100 g of young leaves, it was crushed in a porcelain mortar of 80 mm in diameter, 70 mL of 96% ethanol and macerated in an amber flask for 8 days in complete darkness. It was then filtered to remove leaf residues and stored in the dark and kept under ambient conditions; all this was repeated three times, obtaining three similar extracts.

Phytochemical screening

Using the Miranda and Cuellar Manual qualitative technique, preliminary colorimetric tests were used, which are fast and straightforward for determining secondary metabolites. The presence of alkaloids (Draggendorf), flavonoids (Shinoda), saponins (foam), tannins (Gelatin-Salt), and triterpenes (Liebermann-Burchard) were determined in the ethanolic extracts.

If opalescence (+), turbidity (++), or precipitate (+++) is observed, it is considered that the sample contains the secondary metabolite; in all analyses, 96% alcohol was used as a negative control.

Test for alkaloids

Following the methodology described by Carrera *et al.*⁶, using the Draggendorf reagent, 3 mL of sample was placed in a test tube, then 3 drops of the draggendorf reagent were added, vigorously shaken, and waited for 30 minutes. Caffeine was used as a positive control.

Test for flavonoids

Following the methodology described by Ramos *et al.*⁷, using the Shinoda reagent; For which 3 mL of sample was placed in a test tube, then several magnesium filings were added, the test tubes were placed in a water bath at 60 ° C, then 3 drops of concentrated HCl were placed. Apple was used as a positive control.

Test of saponins

Following the methodology described by Moreno and Jaramillo⁵, using the foam test; for which 3 mL of sample was placed in a test tube, then 5 mL of distilled water was added and vigorously stirred for one minute. Quinoa was used as a positive control.

Tannins test

Following the methodology described by Sánchez and Calle⁸, using the Gelatine-Salt reagent, 3mL of the sample was placed in a test tube, then 2 mL of reagent was added. Black tea was used as a positive control.

Triterpenes test

Following the methodology described by Carrera *et al.*⁶, using the Liebermann-Burchard reagent; for which 3 mL of sample was placed in a test tube, then 1 mL of acetic anhydri-

de was slowly added through the wall of the tube, and finally, with caution, 2 drops of concentrated sulfuric acid were added. *Calendula* was used as a positive control.

Evaluation of antioxidant activity

For this test, the methodology of Noriega *et al.*⁹ was used, for which a solution of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil DPPH was made. For each of the extracts, dilutions were prepared in different concentrations: 10 uL, 50 uL, and 80 uL in amber vials; it was completed with 96% alcohol obtaining a volume of 100 uL; 2.9 mL of DPPH was added to these dilutions until the final volume was 3 mL, it was homogenized and stored in the dark for 30 minutes.

Preparation of the DPPH solution

24 hours before the analysis, 500 mL of DPPH was prepared in 96% ethanol, for which 19.70 mg of DPPH was weighed, it was dissolved in 200 mL of drinking alcohol, then it was added to 500 mL, this The solution was stored in an amber bottle wrapped in aluminum foil refrigerated at 4 °C, a technique described by Castañeda *et al.*¹⁰.

Vitamin C standard curve

The standard was prepared by dissolving 20 mg of ascorbic acid in 100 mL of ultrapure water as described by Noriega *et al.*⁹.

The concentration of vitamin C obtained was 0.2 mg / mL, with which the following dilutions were made:

- 100 uL of vitamin C + 0 uL of pure water
- 80 uL of vitamin C + 20 uL of pure water
- 60 uL of vitamin C + 40 uL of pure water
- 40 uL of vitamin C + 60 uL of pure water
- 20 uL of vitamin C + 80 uL of pure water
- 0 uL of vitamin C + 100 uL of pure water

The prepared solutions were placed in amber vials, and 2.9 mL of previously prepared DPPH was added to these, stirred, and remained in the dark for 30 minutes.

The prepared solutions were placed in 3 mL plastic cells to be analyzed in the spectrophotometer (JASCO V-730) at a wavelength of 517 nm; the samples were analyzed to increase their concentration, each sample was analyzed in triplicate.

The calibration curve obtained in this investigation can be seen in figure 1, which presents an $R^2 = 0.9958$, being acceptable because it is close to 1.

Preparation of samples for analysis in the spectrophotometer

From the extracts of each species under study and the following solutions were made:

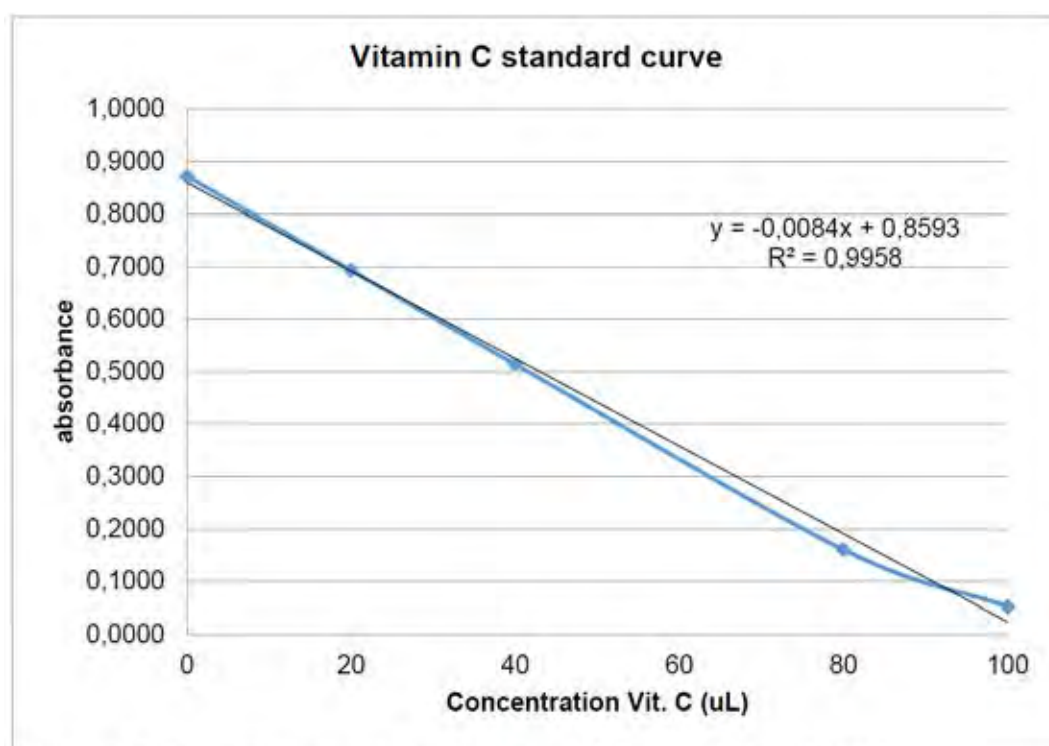
- 10 uL of extract + 90 uL of 96% ethanol
- 50 uL of extract + 50 uL of 96% ethanol
- 80 uL of extract + 20 uL of 96% ethanol
- 100 uL of alcohol 96% + 2.9 mL DPPH

To analyze the samples in the spectrophotometer, the procedure used for vitamin C was replicated.

Results and Discussion

Secondary metabolites identification

The percentage of presence of secondary metabolites in the analyzed extracts of *Epidendrum nocturnum* were: flavonoids 100% in high concentration, tannins 100% in medium concentration, saponins 66.66% in low concentration, alkaloids and triterpenes 0%, the concerning result the alkaloids contrasts with the study done by Sut *et al.*¹¹, who found phenanthrenic alkaloids in species of the genus *Epidendrum*; This would indicate that the species collected has not had an external threat that induces the production of alkaloids, as explained by Farrán *et al.*¹², see table 1 and table 2.



Note: Calibration curves obtained from Microsoft Excel 2013.

Figure 1. Vitamin C calibration curve.

<i>Epidendrum nocturnum</i>					
Metabolites	ALKALOIDS	FLAVONOIDS	SAPONINS	TANNINS	TRITERPENES
Secondary	-	+++	+	+	-
1st extract	-	+++	+	++	-
2nd extract	-	+++	-	++	-
3rd extract	0	100	66.66	100	0

Note: Negative (-), little presence (+), moderate presence (++), high presence (+++).

Table 1. Phytochemical screening of *Epidendrum nocturnum*.



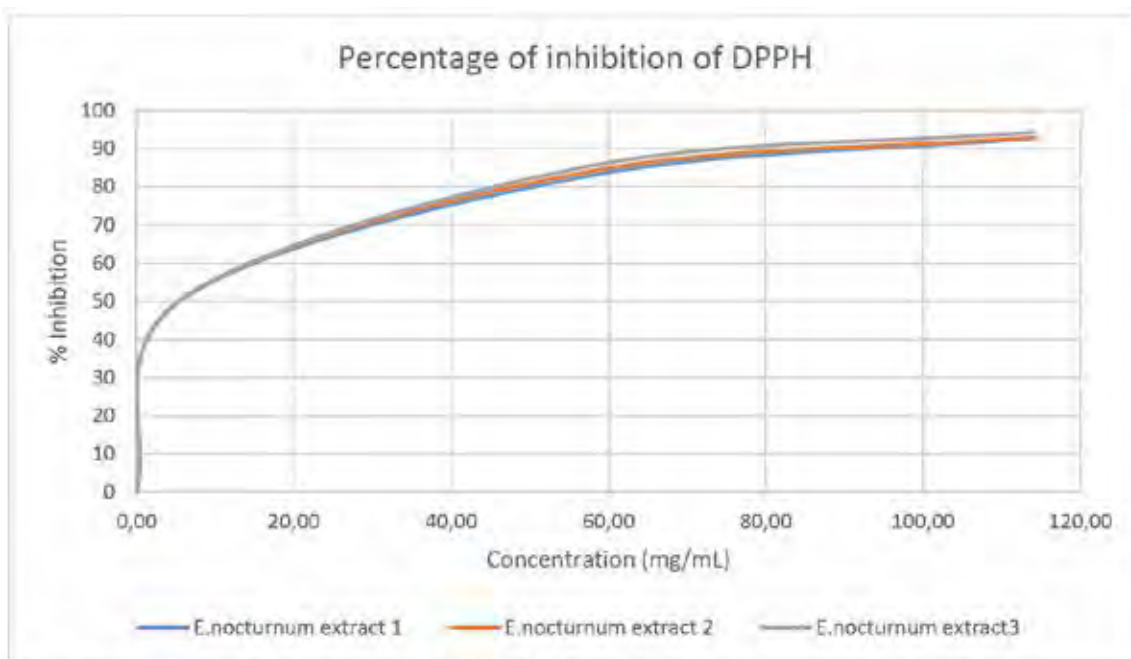
Table 2. Secondary metabolites analysis.

Note: Photographs of the tests carried out in the CIVABI UPS.

Evaluation of antioxidant activity

The extracts of *E. nocturnum* showed antioxidant capacity. The three extracts had similar results that, on average with a concentration of 3.50 ppm they inhibited 50% of the DPPH free radicals. See figure 2.

It was observed that the *Epidendrum nocturnum* species exceeded the antioxidant capacity of *Prosthechea michuacana* reported by González *et al.*¹³, which required 13.22 ppm to inhibit the % IC50 of DPPH.



Note: Percentage of inhibition of DPPH of *Epidendrum nocturnum* obtained from Microsoft Excel 2013.

Figure 2. Percentage of inhibition of DPPH of *Epidendrum nocturnum*.

Conclusions

The secondary metabolites present in *Epidendrum nocturnum* in 100% were flavonoids and tannins; in saponins, it was 66.66%.

The antioxidant activity analysis showed in the 3 extracts *Epidendrum nocturnum* with only 3.5ppm inhibited 50% of DPPH free radicals.

Epidendrum nocturnum presented a significant antioxidant capacity and a high presence of flavonoids in its composition, confirming that this secondary metabolite contributes to these plants' antioxidant capacity.

Bibliographic references

1. F. María, Orquídeas, Buenos Aires: ALBATROS, 2011.
2. L. Endara y L. Jost, «Orchidaceae,» de Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador., Quito, Ecuador, Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2011.
3. M. Hossain, «Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances—An overview,» *Fitoterapia*, vol. 82, pp. 102-140., 2011.
4. C. Rivas-Morales, M. Oranday-Cárdenas y M. Verde-Star, Investigación en plantas de importancia médica, Nuevo León: Omnia-Science, 2016, pp. 105-121.
5. N. Moreno y B. Jaramillo, «Análisis fitoquímico preliminar de *Pachira quinata* (Jacq.) WS Alverson,» *Boletín Semillas Ambientales*, vol. 11, n° 1, pp. 30-39, 2017.
6. G. Carrera, E. Benedito, T. Souza-Leal, C. Pedroso-De-Moraes y F. Gaspi, «Testes fitoquímicos em extratos foliares de *Oeceoclades maculata* Lindl.,» *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, vol. 16, n° 4, pp. 938-944, 2014.
7. P. Ramos, G. Colareda, M. Rosella, S. Debenedetti, E. Spegazzini y A. Consolini, «Phytochemical profile and anti-inflammatory effect of the orchid *Catasetum*,» *Latin American Journal of Pharmacy*, vol. 31, n° 1, pp. 62-67, 2012.
8. A. Sánchez y D. Calle, «Evaluación fitoquímica y determinación de flavonoides en hojas de *Ficus benjamina* L. Xilema,» *Xilema*, vol. 28, n° 1, pp. 61-67, 2015.
9. P. Noriega, T. Mosquera, A. Baldisserotto, J. Abad, C. Aillon, D. Cabezas, J. Piedra, I. Coronel y S. Manfredini, «Chemical Composition and in-vitro biological activities of the essential oil from leaves of *Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav.,» *American journal of essential oils and natural products*, vol. 2, n° 4, pp. 29-31, 2015.
10. B. Castañeda, E. Ramos y L. Ibáñez, «Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas,» *Horizonte médico*, pp. 61-62, 2008.
11. S. Sut, F. Maggi y S. Dall'Acqua, «Bioactive secondary metabolites from orchids (Orchidaceae) 14.11 (2017): e1700172,» *Chemistry & biodiversity*, vol. 14, n° 11, pp. 1-30, 2017.
12. A. Farrán, C. López, M. Pérez y M. D. Santa María, *Química bioorgánica y productos naturales*, Madrid: UNED, 2017.
13. A. Neira, Aislamiento e identificación de los compuestos con actividad antioxidante del extracto de cloroformo de la orquídea comestible *Prosthechea michuacana*., México: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico, 2009.

Received: 15 October 2020

Accepted: 14 november 2020

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Chemical Pretreatments on Residual Cocoa Pod Shell Biomass for Bioethanol Production

Jose F. Alvarez-Barreto^{1*}, Fernando Larrea², Maria C. Pinos¹, Jose Benalcázar¹, Daniela Oña¹, Carolina Andino¹, Daniela A. Viteri¹, Marco Leon², Daniela Almeida-Streitwieser¹

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.9

Abstract: Cocoa pod shell is an essential agricultural residue in Ecuador, and this study addressed its potential valorization for bioethanol production. For this, three types of pretreatments, acid, alkaline, and autohydrolysis, were applied to pod shells from two different cocoa types, national and CCN-51, to remove the lignin. Untreated and treated biomasses were characterized by composition, thermal stability, Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR), and scanning electron microscopy (SEM). The treated biomass was then enzymatically hydrolyzed with cellulase. Reducing sugars were quantified after pretreatments and enzymatic hydrolysis, and the pretreatment liquors and the enzymatic hydrolysates were subjected to alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. There were substantial differences in composition between both biomasses, particularly in lignin content, with national cocoa having the lowest values. All pretreatment conditions had significant effects on biomass composition, structure, and thermal properties. After alkaline pretreatment, the biomass presented the highest cellulose and lowest lignin contents, resulting in the highest reducing sugar concentration in the pretreatment liquor. The highest lignin content was found after the acid pretreatment, which resulted in low, reducing sugar concentrations. Autohydrolysis produced similar results as the acid pretreatment; however, it resulted in the highest sugar concentration after enzymatic hydrolysis, while the acid-treated sample had negligible levels. After fermentation, there were no differences in productivity among the pretreatment liquors, but autohydrolysis had the largest ethanol yield. In the hydrolysates, it was also autohydrolysis that resulted in higher productivity and yield. Thus, there is an indication of the formation of inhibitors, both enzymatic activity and ethanol production, in the acid and alkaline pretreatments, and this should be tackled in future research. Nonetheless, given the crucial changes observed in biomass, we believe that cocoa pod shell pretreatment has potential for the generation of reducing sugars that could be further used in different bioprocesses, not only bioethanol production.

Key words: Lignocellulosic biomass, bioethanol, cocoa, pretreatment, bioprocesses.

Introduction

Currently, 83% of the world's energy demand is satisfied by burning fossil fuels; The Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) found that fossil fuels are the main generators of greenhouse gases, which accelerate global warming¹. Thus, there is urgency in developing alternative fuels, such as biodiesel from food waste²; and second-generation bioethanol from residual lignocellulosic biomass³.

The primary sources of lignocellulosic biomass are agricultural residues, wood, and energy crops. This biomass is mainly composed of cellulose (35-50%), hemicellulose (20-35%), lignin (10-25%), and, to a lesser extent, there are proteins, pectin, oils, and ashes⁴. However, lignocellulosic biomass has a complex structure because cellulose is wrapped in a hemicellulose matrix, which, in turn, is surrounded by lignin walls. The latter is a rigid mesh because of the aromatic subunits in its macromolecular structure⁵.

Studies have shown that implementing a biomass pretreatment is crucial to break down the lignin structure, eliminate hemicellulose, reduce the crystallinity of cellulose, and increase the available surface area for enzymes and microorganisms to act⁶. Pretreatments are classified as physical, chemical, and biological, but they can also be combined to increase bioprocess performance and productivity of the desired product⁷.

A commonly used biological pretreatment of lignocellulosic biomass is enzymatic hydrolysis since it releases sugars

that will later be transformed into ethanol thanks to fermentation⁸. However, low yields are observed due to the complex structure of lignocellulosic biomass. For this reason, before enzymatic hydrolysis, acidic and alkaline pretreatments have been used to remove lignin and hemicellulose and decrease the cellulose crystallinity⁴.

Some biomasses have already been pretreated using these technologies and assessed for bioethanol production. Among the most studied sources are sugarcane bagasse, fruit waste, and water-insoluble fractions of sugar straw. In these studies, industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* for alcoholic fermentation has been used⁹. Other less conventional sources, such as sweet sorghum, have also been explored, with promising results¹⁰.

Cocoa pod husk represents a lignocellulosic residue poorly explored as raw material for bioethanol production. Ecuador is one of the largest cocoa producers in the world. In 2015, 236,677 thousand metric tons of cocoa beans were exported, where 47% corresponds to fine aroma cocoa, and the rest comes from a less flavorful but more productive clone called CCN-51 (Colección Castro Naranjal 51)¹¹. Moreover, according to the Bioenergetic Atlas of Ecuador, this translated into more than 2 million tons of waste, mostly derived from the pod shell¹². Usually, these residues are used as organic compost; however, no study demonstrates their fertilizing capacity. Animal feed has also been explored, but the pod has theobromine,

¹ Institute for the Development of Alternative Energies and Materials, IDEMA. Department of Chemical Engineering, Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.

² Institute for Materials Research and Applications, IIMA. Department of Mechanical Engineering, Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.

a hepatotoxic alkaloid, and can be harmful to animal health¹³. For this reason, the cocoa pod shell, being a very abundant agricultural residue, can be used as a source of great importance for the production of bioethanol.

Therefore, the present work aims to evaluate the effects of different chemical pretreatments followed by enzymatic hydrolysis on biomass composition and properties and the generation of reducing sugars, both in the pretreatment liquors and enzymatic hydrolysates, and their potential use in alcoholic fermentation.

Materials and methods

Pod shells from two cocoa types were subjected to three different pretreatments: alkaline, acid, and autohydrolysis, and the liquors were stored. The resulting solids were then subjected to enzymatic hydrolysis, using cellulose. After that, alcoholic fermentations were carried out from the pretreatment liquors and hydrolysates. In Figure 1, the block diagram for obtaining ethanol from a cocoa pod shell is presented.

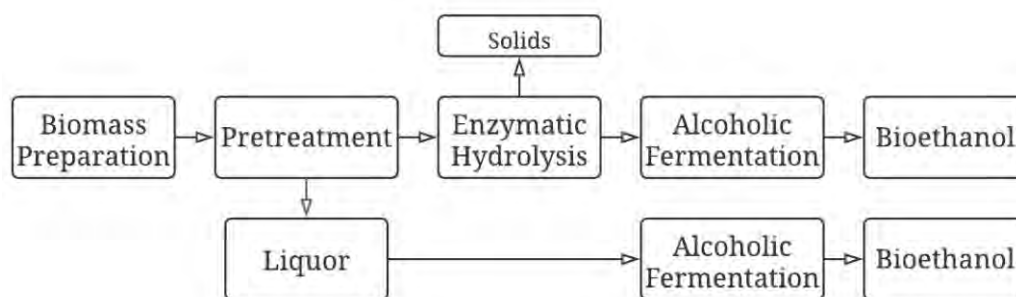


Figure 1. Block diagram for cocoa pod shell valorization to produce bioethanol.

Biomass preparation

Pod shells from the delicate aroma, national cocoa, and CCN-51 clone (Coleccion Castro Naranjal 51) were collected, thoroughly washed, cut into 1x1cm pieces, and dried at 60 °C until constant weight. Then, the dry sample was ground and sieved to a particle size range of 150 and 600µm.

Bioethanol production

Biomass Pretreatment

For each pretreatment, 1g of dry sample was pretreated with 15mL of solution for 4 hours at 100 °C, under reflux, according to our laboratory's preliminary results (Data not shown). The pretreated biomass was thoroughly rinsed in distilled water until neutral pH and dried at 40°C, until constant weight. The pretreatment liquor was saved for fermentation and reducing sugar quantification. Pretreatments consisted of 2% w/v NaOH for the alkaline conditions, 2% v/v sulfuric acid for the acid attack, and distilled water for autohydrolysis¹⁴.

Enzymatic hydrolysis

For the enzymatic hydrolysis, 7g of pretreated biomass were suspended in 50mL of sterile 50mM sodium citrate buffer solution, at pH 4.8, in an amber bottle. Cellulase (Rohment CL) was added at a concentration of 177 (ECU / mL). The bottle was then purged with N₂ and capped. Hydrolysis was carried out at 55 °C and 50rpm for 72 hours¹⁵. The hydrolysate was separated through filtration for further fermentation, and the biomass was rinsed and dried as previously described for characterization.

Fermentation

In a 50mL conical tube, previously autoclaved, 30mL of the pretreatment liquor or hydrolysate was placed. Then, *S. cerevisiae* (RC212 yeast) was added at 8g/L and activated at 30 °C for 20 minutes. Fermentation was carried out in a microbiological incubator at 30°C for 72 hours¹⁶. Finally, samples were taken from each of the fermenters after 24, 48, and 72 hours for sugar quantification.

Biomass Characterization

Composition

The untreated and pretreated biomass, moisture, fat, protein, and ash contents were determined according to standardized methods¹⁷⁻²⁰.

To determine cellulose content, the method reported by Dominguez *et al.* (2012) was followed. Briefly, 1g of dry sample was treated with 15mL of 80% acetic acid, along with 1.5mL of 68% nitric acid, for 20 min, under reflux. This was followed by filtration with hot water and small amounts of ethanol. As a

next step, the sample was placed in crucibles and dried in the oven at 105°C for 24 hours. The sample was allowed to cool, weighed, and placed in the muffle for 5 hours at 540 °C²¹. Finally, the cellulose content was determined through equation (6).

$$\%Cellulose = \left[\frac{W_f - W_c}{W_i} \right] \times 100\% \quad (6)$$

Where, W_f, W_c, and W_i are the dry, calcined, and initial sample weight, respectively.

To determine lignin composition, 1 g of dry sample was suspended in 15mL of 72% sulfuric acid and stirred for 2 hours. The mixture was then mixed with 125mL of distilled water and boiled, in a reflux system, for 4 hours. Finally, the remaining solids were separated through filtration, washed with hot water and dried at 105 °C for 3 hours¹⁷. Lignin content was estimated through equation (7).

$$\%Lignin = \left[\frac{W_f}{W_i} \right] \times 100\% \quad (7)$$

Where W_i and W_f are the initial sample weight and the weight after drying, respectively.

Physical-chemical characterization

To assess other significant compositional changes in the biomass due to pretreatment, Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) was used. Spectra between 500-4000 cm⁻¹ were obtained in a Cary 630 FTIR Spectrometer from Agilent Technologies. Meanwhile, changes in biomass morpho-

logy were assessed through Scanning Electron Microscopy (SEM). Untreated and pretreated biomasses were analyzed in a JEOL JSM-IT300 Scanning Electron Microscope at 50Pa and 20kV, using the MP-96040EXCS External Control Software for image processing.

The Thermal characterization was made to observe any changes produced in the biomass's thermal stability after each pretreatment, as this is an indication of biomass composition and interaction among its components. Thermogravimetric analysis (TGA) was carried out in a PerkinElmer Simultaneous Thermal Analyzer STA 8000, where 5 mg of sample were heated from 25°C to 600 ° C, with a heating ramp of 10 ° C / min. Nitrogen was used as inert gas with a flow of 20 ml/min.

Reducing Sugars and Ethanol Quantification

For reducing sugar quantification, the 3,5-dinitro-salicylic-acid (DNS) method was used²², using a Hach Colorimeter DR / 870. A calibration curve was generated with solutions of known glucose concentrations.

To measure the ethanol obtained after each fermentation, the sample was initially centrifuged and filtered, followed by liquid-liquid extraction with dichloromethane, at a 2: 1 ratio. The organic phase was removed, and propanol was added, as an internal standard, at a 25:2 ratio. Finally, ethanol was quantified using gas chromatography in a GCMS-QP2010. Using a calibration curve, ethanol concentration was determined by relating the peak areas corresponding to ethanol and the internal standard. On the other hand, productivity was determined as grams of EtOH per kilograms of untreated biomass. While the yield was defined as the moles of EtOH divided by the moles of glucose present in the fermentation.

Statistical analyses

All analyzes and experiments were carried out in triplicates (n = 3). Results are reported as the (average ± standard deviation). Statistically significant effects were determined through an Analysis of Variance (ANOVA), and Tukey's pairwise comparison was used to determine differences, with a 95% confidence level (p <0.05).

Results and Discussion

Characterization of cocoa pod shells

Knowing the initial biomass composition is essential to know its variability regarding the cocoa type and assess the extent of changes caused by pretreatments. The proximal characterization of the cocoa pod shell for the two studied varieties is shown in Table 1.

Significant differences can be observed between national cocoa and CCN-51, perhaps being lignin content the most important. One of the primary purposes of biomass pretreatment is eliminating or altering lignin structure, and these differences can have significant repercussions on pretreatment conditions. In general, cocoa biomass composition is variable, as recognized in the literature. Campos-Vega reported the composition ranges of the cocoa pod's shell, where protein content is between 2.1–9.1%, ash is between 5.8–13.0%, and the lignin content is 14.7–38.8%²³. This variability is related to the variety and irrigation, fertilizers used, transport, storage, soil, other factors²⁴, and crop's climatic and environmental conditions²⁵.

Characterization of pretreated biomass

Pretreatment yields, defined as the ratio between the treated and untreated biomass, are essential for industrial applications. It would give a clear indication of the amount of residual pod shell needed to produce a desired amount of bioethanol. The values of pretreatment yield for each of the biomasses are presented in Figure 2.

In general, it was found that, for all pretreatments, the yield was lower for CCN-51. In both cocoa types, the alkaline pretreatment resulted in the lowest yield (p<0.05), with values of (58.24±3.40)% and (37.72±1.57)% for national and CCN-51, respectively. On the other hand, autohydrolysis had the highest yields, with values of (70.69±0.34)% for national cocoa and (50.15±0.24)% for CCN-51. The lower yield levels found on CCN-51 variety may be related to its high lignin content, and this could be explained through the composition of the pretreated biomasses, shown in Figure 3. In the case of national cocoa (Figure 3a), the acid pretreatment presented the highest lignin content (43.14±2.15)%, while the alkaline pretreatment had the lowest lignin percentage, (18.75±3.31)%, and the highest cellulose composition of (57.34±7.29)%. Cellulose content was always higher than in the pretreated biomass, a pattern that was also observed in CCN-51 (Figure 3b). Nonetheless, for the latter, lignin composition, after any pretreatment, was lower than that of the untreated biomass. Once again, the alkaline pretreatment resulted in the highest and lowest lignin and cellulose contents, with values of (24.43±4.01)% and (55.19±1.65)%, respectively. There were no significant differences between the acid treatment and autohydrolysis.

As previously mentioned, the pretreatments' purpose is to depolymerize lignin and, possibly, hemicellulose structures. Furthermore, in this process, part of the cellulose is also hydrolyzed into reducing sugars, useful in subsequent bioprocesses²⁶. At the same time, the remaining cellulose would be more readily available for enzymatic hydrolysis. The acid hydrolyses hemicellulose and dissolves lignin by breaking glycosidic bonds, which leads to polysaccharides being transformed

Parameter	Cocoa Type	
	National	CCN-51
Cellulose	20.04±0.73	25.34±3.05
Lignin	23.15±0.01	46.61±2.89
Ash	8.52±1.11	8.45±0.84
Fats	0.25±0.04	0.17±0.11
Protein	0.10±0.02	4.12±0.04

* Dry base. All values are reported as percentages

Table 1. Characterization of the pod shell from different cocoa types.

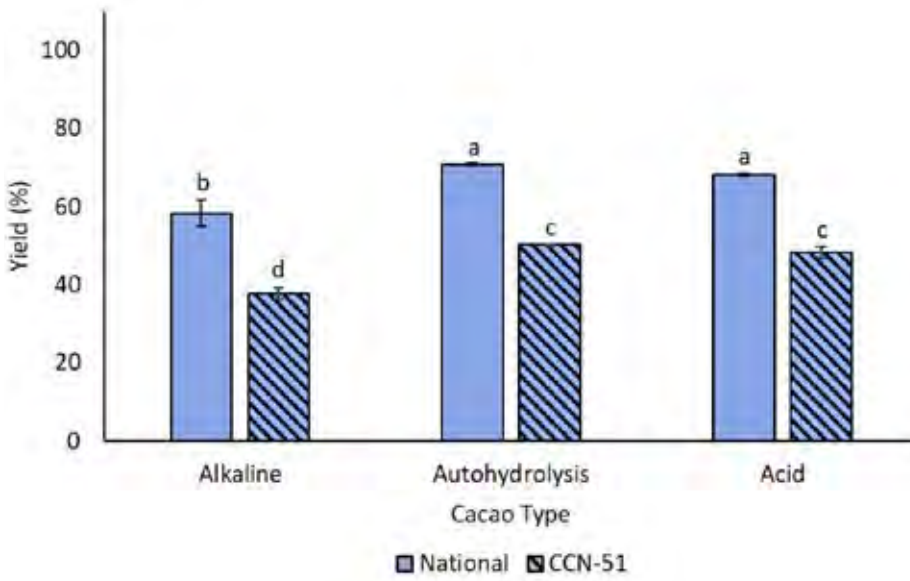


Figure 2. The yield of the pod shell, from different cocoa types, after each pretreatment. Pretreatments with the same letters do not present statistically significant differences

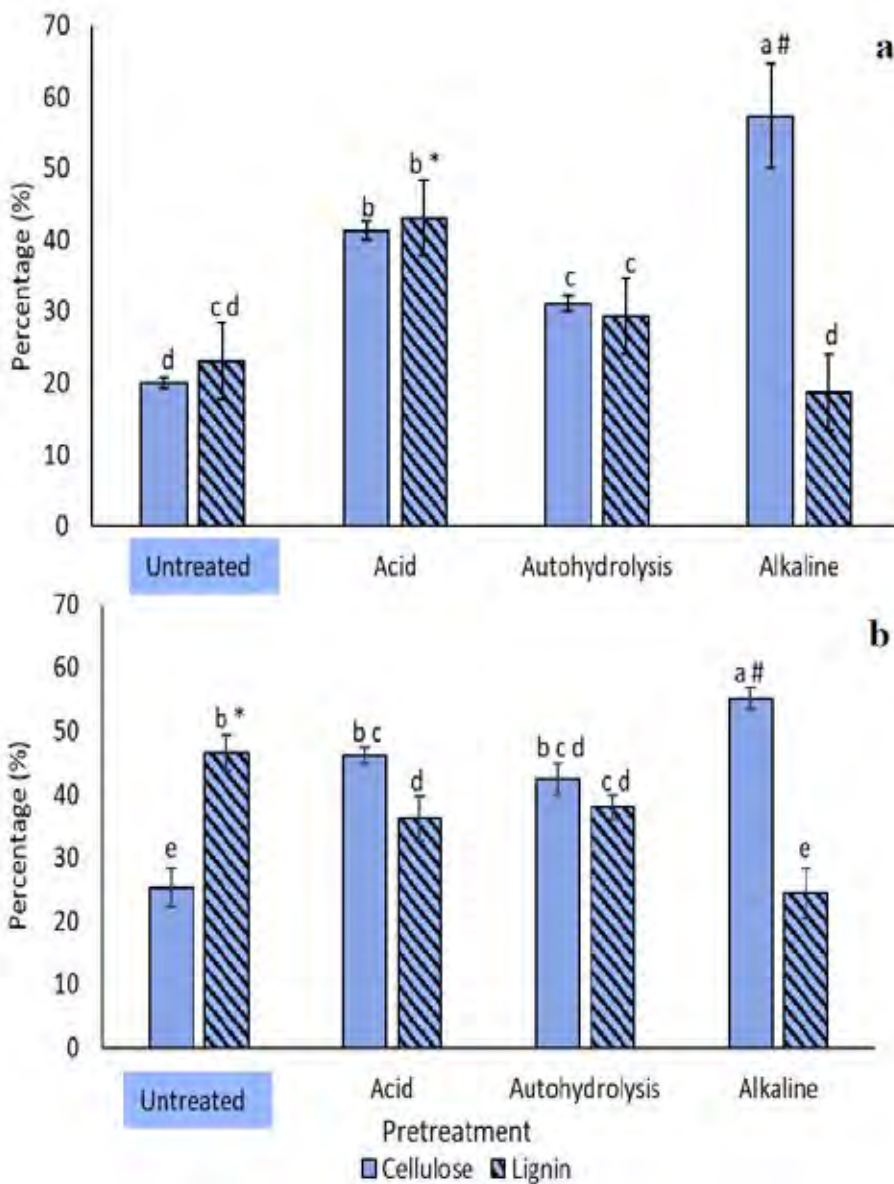


Figure 3. Lignin and cellulose content before and after each pretreatment applied to the husk of a) National cocoa and b) CCN-51 pod. (*) and (#) represent maximum amounts of lignin and cellulose content, respectively ($p < 0.05$). Pretreatments with the same letters do not present statistically significant differences.

into oligomeric and monomeric sugars⁷. However, the acid concentrations and temperatures used in this work are low compared to others reported in the literature^{27,28}, and de-lignification is less significant than autohydrolysis, where only water was used.

On the other hand, the alkaline pretreatment breaks the lignin structure by swelling cell walls and reducing its crystallinity, increasing the surface area of cellulose²⁹. This pretreatment seemed to be more efficient at delignifying both types of biomass, a fact of the high cellulose contents corroborate that. Moreover, the extent of delignification may be responsible for the lower yields observed for the CCN-51 samples. As they have higher lignin contents, and the alkaline pretreatment proved successful at eliminating lignin, the greater mass was lost in the pretreatment of this cocoa type.

Changes in cocoa pod shell morphology after each pretreatment

As biomass composition was altered after pretreatment, it was essential to evaluate morphological changes that could explain, from a physical standpoint, what occurred to the structure³⁰. Figure 4 shows the micrographs of untreated and treated biomass for both cocoa types.

For national cocoa (Figures 4 a-d), significant changes can

larger yields, National Cocoa was further studied, and thereby, the following results pertain to this type of biomass.

Compositional analyses by FTIR spectra

National cocoa pod shell biomass, both untreated and pretreated, was analyzed by FTIR to corroborate compositional changes, and the resulting spectra are presented in Figure 5, where changes in the presence of peaks and peak intensity took place. In this section, peaks will be mentioned about the untreated biomass, as a shift in the entire spectra was observed for the pretreated samples, a pattern that was reproduced in the laboratory. A small-signal can be found at $1,164\text{ cm}^{-1}$ due to cellulose C-O-C asymmetric stretching³²; this peak increases in intensity after pretreatments, becoming most visible after the alkaline attack. A similar effect is observed at 830 cm^{-1} , which represents cellulose β -glycosidic linkages³³. The band at 1232 cm^{-1} corresponds to the C-O stretching of hemicellulose and lignin, a signal that significantly decreases in the acid and alkaline samples. Bands associated with skeletal vibrations of aromatic rings within the lignin structure are seen at 1510 and 1680 cm^{-1} ³⁴, with the latter reducing its intensity in the pretreated alkaline sample. The peak at 1732 cm^{-1} corresponds to ketone and aldehyde vibrations (C=O) from hemicellulose³³, and it can be seen that this signal is maintained after auto-

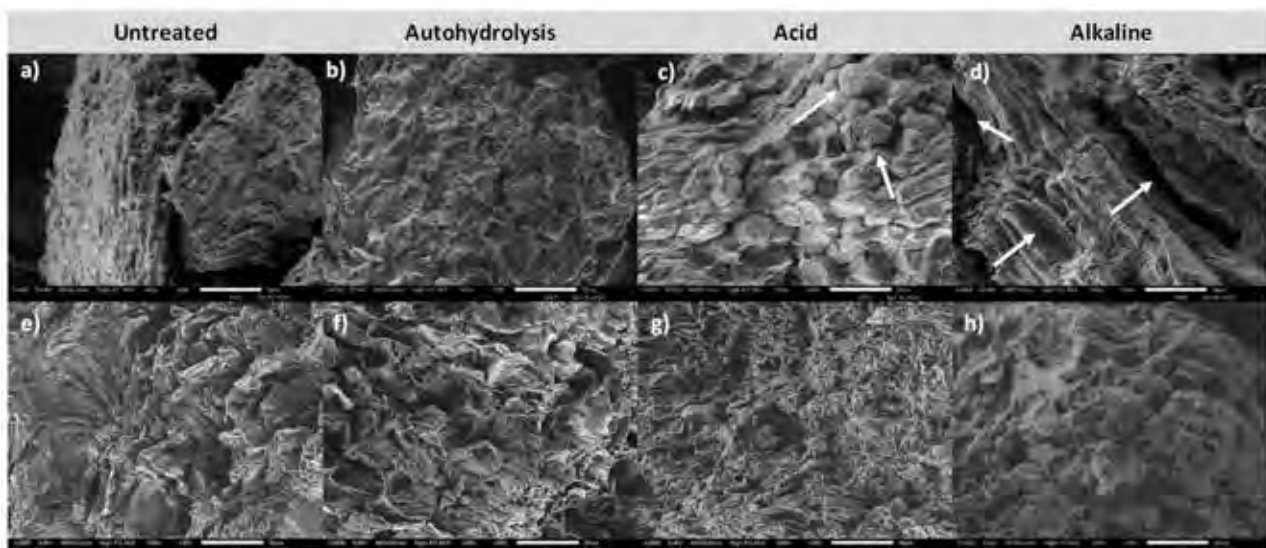


Figure 4. Scanning electron micrographs of pod shell biomass from National Cocoa (top row) and CCN-51 (bottom row) at 500x magnification. Untreated (a,e), autohydrolysis (b,f), acid (c,g) and alkaline (d,h). Arrows indicate cracks and structures resulting from possible biomass degradation. Calibration bar: 50 μm .

be observed after the pretreatments. The untreated biomass had limited porosity and resulted from autohydrolysis (Fig. 4a and b). The acid pretreatment (Fig. 4c) seemed to generate a slight degradation in terms of the biomass structure, as implied by different structures' appearance (arrows). On the other hand, the biomass after alkaline pretreatment (Fig. 4d) presents a series of pores and cracks (arrows) that could also be a sign of degradation, which may be due to a higher degree of lignin removal, as found in changes in biomass composition (Fig. 3a). It should be taken into account that part of the hemicellulose could also be degraded during the alkaline pretreatment, decreasing the xylan content in the lignocellulosic material, leading to a greater extent of biomass degradation³¹.

In CCN-51 (Figures e-f), the changes are less apparent in porosity, but some modifications can be observed on surface roughness. Thus, given the more significant changes in biomass morphology, along with greater de-lignification, and

hydrolysis but significantly reduced by the acid and alkaline treatments.

The observations from the spectra corroborate what was found in changes in biomass composition (Figure 3). There is a clear indication of more excellent cellulose content, evidenced by the higher peak intensities after pretreatments, especially in the pretreated alkaline biomass. Similarly, reduction in signals corresponding to the lignin structure is under the de-lignification claimed previously. However, there is new information gathered in Figure 6, as peaks related to hemicellulose also decrease significantly, indicating that all pretreatment conditions produce hemicellulose hydrolysis, as reported by Poletto *et al.* (2012)³⁵. Pupiales *et al.* (2020) reported a similar behavior for the alkaline pretreatment of the mesocarp from cocoa pod shell when producing porous sponges for biomedical applications³⁴.

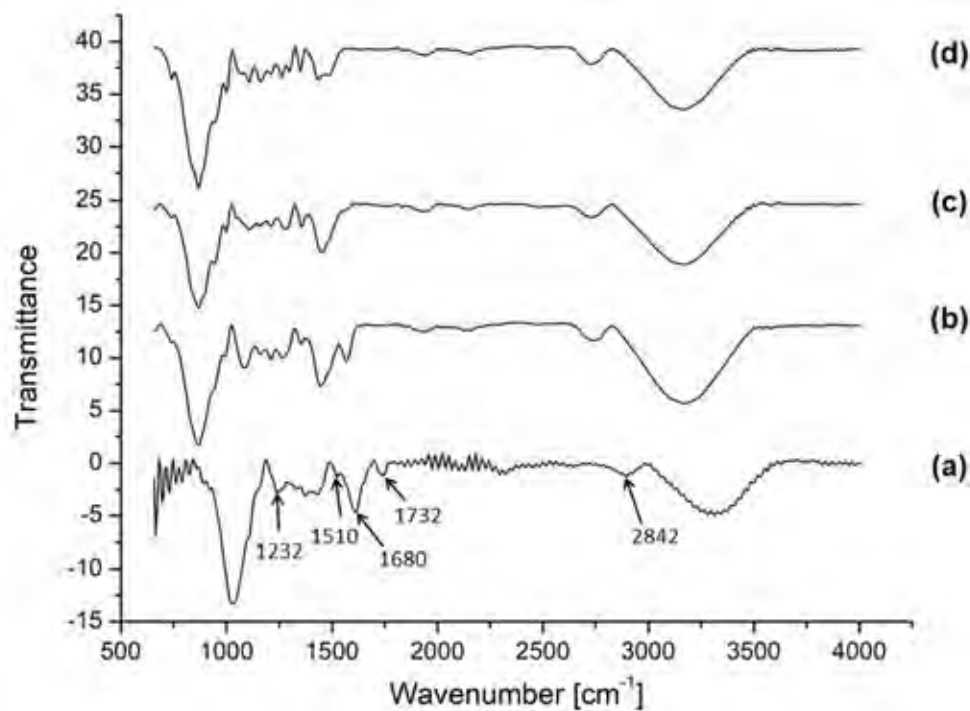


Figure 5. FTIR spectra of the untreated biomass (a) and biomass pretreated under (b) autohydrolysis, (c) acid, and (d) alkaline.

Biomass thermal stability

TGA was performed on untreated and pretreated biomass to observe the changes produced in the biomass's thermal stability, corroborating changes in its structure and composition.

As seen in Figure 6, the curves of mass loss concerning

temperature varied for each sample, with the untreated biomass (Fig. 6a) having a less pronounced slope in the degradation section between 160 and 400°C. In its first derivative, multiple peaks are seen before reaching the maximum degra-

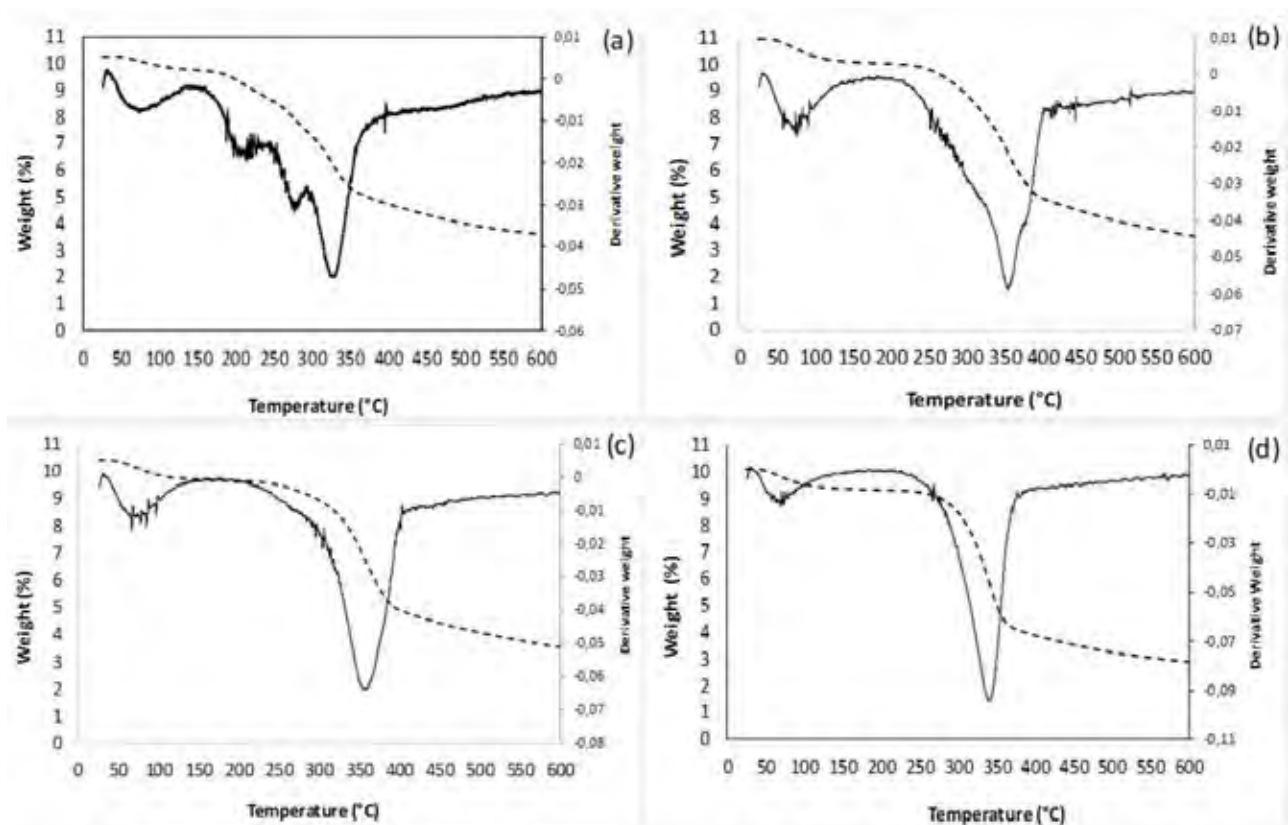


Figure 6. Thermogravimetric analysis for biomass samples a) untreated, b) acid, c) autohydrolysis, and d) alkaline pretreatments. Dotted and solid lines represent weight loss with temperature and its first derivative, respectively.

dition temperature, which may correspond to the sample's heterogeneity with other components, such as pectin, lipids, polyphenols, and other carbohydrates were not quantified³. It has been previously reported that the temperature of maximum degradation for pectin is about 250°C³⁶. With the treated samples, this effect disappears, and only a peak related to water evaporation remains. Nevertheless, the curves shift, and the initial and maximum degradation temperatures change, as reported in Table 2.

Pretreatment	Initial degradation temperature [C°]	Max degradation temperature [°C]
Biomass	163	334.46
Alkaline	212	348.54
Acid	220	367.50
Autohydrolysis	224	361.43

Table 2. Initial and maximum degradation temperatures obtained from the thermogravimetric analysis of untreated and treated biomass

The initial and maximum degradation temperature varied concerning each of the pretreatments; this may be a consequence of the cellulose molecule's release, a polymer with many strong, crystalline, unbranched glucose units³⁷. It is observed, in Figure 2, that acidic pretreatments and autohydrolysis have a higher composition of lignin, which is more difficult to degrade, having three stages: the first related to water evaporation, the second, between 200 and 450°C, is due to the evaporation of phenols, and the third, above 400°C, relates to the disintegration of aromatic rings³⁷. It is within the second stage that the temperature of maximum degradation was observed.

Biomasses resulting from acid and autohydrolysis, which had similar compositions, presented similar values in maximum and initial degradation temperatures. However, those from the alkaline pretreatment, having a lower lignin concentration, and being lignin more difficult to degrade²⁸, presented a lower temperature of maximum degradation and started to degrade earlier. The untreated biomass, on the other hand, presented a different behavior as it is a more heterogeneous matrix, due to the presence of other compounds, previously mentioned, which played a significant role in degradation, which started at the lowest temperature of all the samples, as well as the lowest temperature of maximum degradation. These results follow what was observed in the FTIR analyses, where evidence in lower lignin content for the alkaline treated biomass could result in lower thermal stability. Simultaneously, those from the autohydrolysis and acid treatment were more thermally stable, perhaps due to higher lignin and hemicellulose contents.

Reducing sugars after pretreatments and enzymatic hydrolysis

Once the pretreatment and enzymatic hydrolysis processes had been completed, the concentrations of reducing sugars present in the pretreatment liquors and enzymatic hydrolysates were determined to assess potential uses in bioprocesses. In Figure 7, it can be observed that, after the alkaline pretreatment, the highest sugar concentration of (46,46±1,98) g/L was obtained, while autohydrolysis and the acid pretreatment resulted in similar concentrations between 14 and 15g/L. Except for autohydrolysis, sugar concentration in the hydrolysates was lower than those found in the pretreatment liquors, and those resulting from acid and untreated biomass (not

shown) had negligible sugar levels. In this case, the samples from autohydrolysis were hydrolyzed best by the enzyme, with a sugar concentration of (17.21 ± 5.51) g/L.

Alkali pretreatment is an effective way to remove lignin by causing swelling; it also causes partial hydrolysis of hemicellulose and cellulose³⁸. This may be the reason for the highest sugar concentration in the alkaline pretreatment liquor. On the other hand, acid pretreatments solubilize lignin and have proven to be efficient at hydrolyzing cellulose and he-

micellulose³⁹. However, most dilute-acid treatments reported in the literature occur at higher temperatures (above 130°C) than those used in the present study. Thus, the relatively low temperature could have affected this effect, but higher temperatures result in economically unfeasible processes reported by some authors²⁸. Autohydrolysis had a similar effect to that of the dilute acid, but usually with lower yields⁴⁰; in this case, given the reduced acid effect due to lower temperatures, it could imply that similar sugar concentrations were obtained after both pretreatments.

But acid treatments pose other vital limitations. During dilute-acid attacks on biomass, important enzyme inhibitors, such as hydroxymethylfurfural (HMF) and the furfural compound, can be generated due to the degradation of pentoses and hexoses⁴¹. This effect is less relevant under alkaline conditions; nonetheless, some authors have reported that, for cellulase to act efficiently on alkaline-pretreated lignocellulose, lignin concentration should be below 18%, lower than the levels achieved for the cocoa pod shell biomass⁴⁰. Therefore, despite being a suitable method for producing reducing sugars during pretreatment, the alkaline pretreatment herein used is not suitable for subsequent enzymatic hydrolysis. This method should be studied further, modifying processing variables.

Sugar consumption during fermentation of the pretreatment liquors and enzymatic hydrolysates

Despite the important differences observed in reducing sugar concentrations and the potential generation of inhibitory by-products from the pretreatments, it was essential to assess their fermented capacity. Curves of sugar consumption in the fermentation of pretreatment liquors and enzymatic hydrolysates are shown in Figure 8. When fermenting liquors (Fig. 8a), sugars were consumed in a similar trend for all of them, with over 95%.

During hydrolysate fermentation (Fig. 8b), a different behavior was found. In this case, after 24h, the remaining sugars were (46,10±0,15)% and (17,14±0,30)% for enzymatic hydrolysates of samples from autohydrolysis and alkaline pretreatments, respectively. After 72h, a significant amount of sugars remained (13-17%), implying that yeast growth is slower than in liquor fermentation. The alkaline-pretreated samples could be attributed to the low sugar concentrations after hydrolysis, resulting in insufficient nutrients or the generation of growth inhibitors, such as furan derivatives and polyphenols⁴².

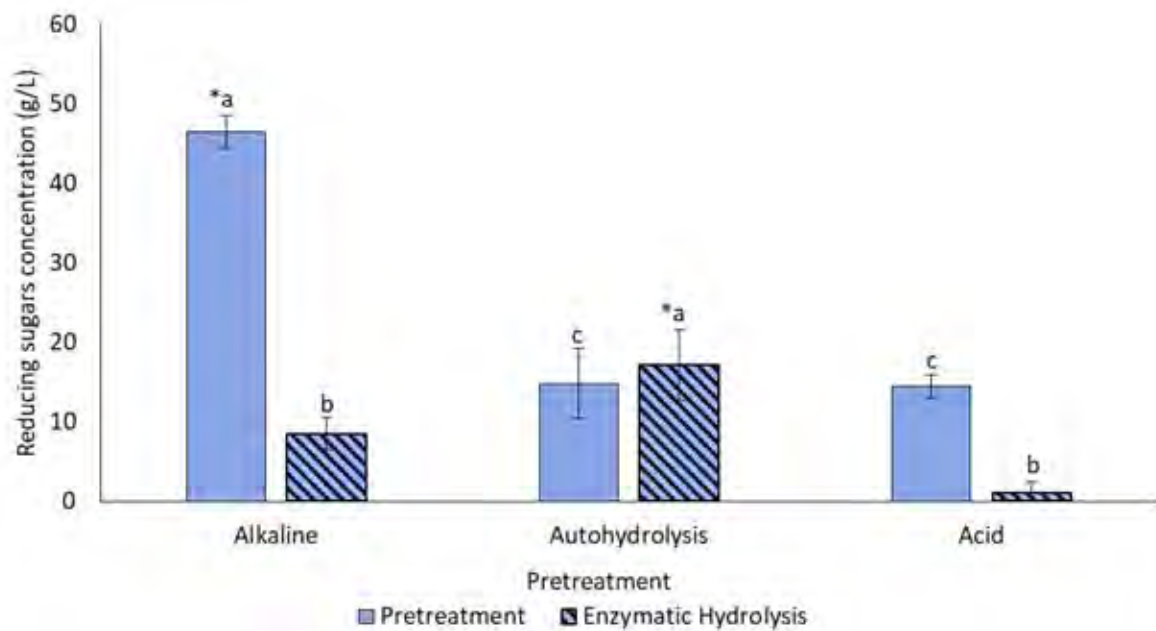


Figure 7. Reducing sugar concentration in each pretreatment liquor and enzymatic hydrolysate. (*) Represents the maximum concentration of the pretreatments ($p < 0.05$). Pretreatments with the same letters do not present statistically significant differences.

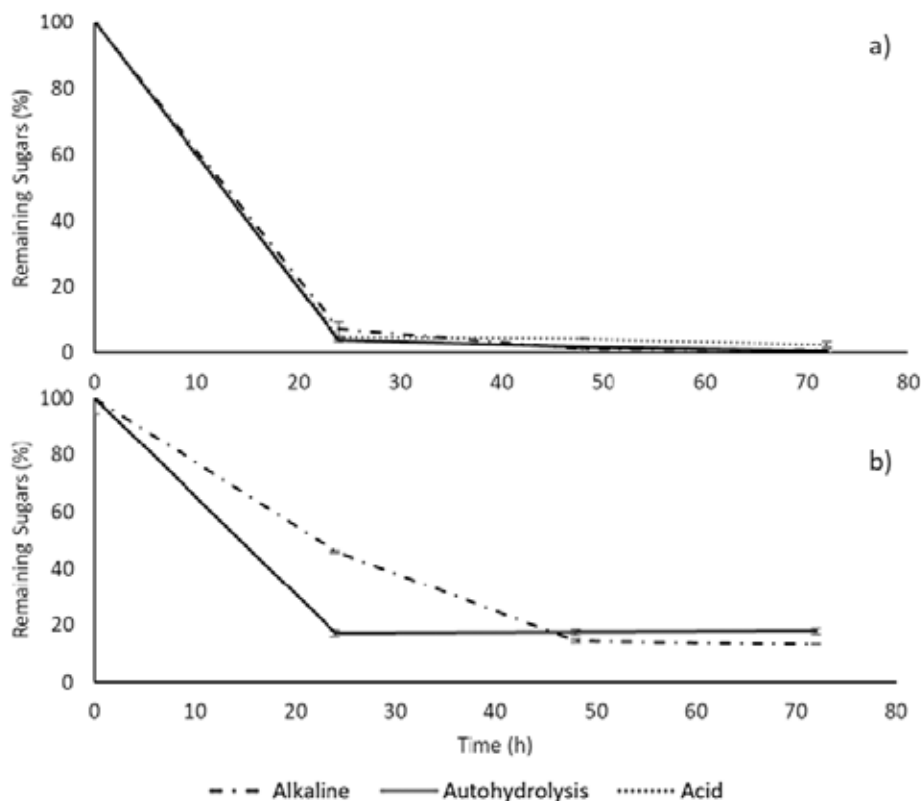


Figure 8. Kinetics of sugar consumption is represented by the percentage of remaining reducing sugars in time, fermentation of a) pretreatment liquors, and b) enzymatic hydrolysates. * Fermentation of the enzymatic hydrolysis was not carried out for the acid pretreatment biomass due to negligible initial sugar concentrations.

Bioethanol production

Bioethanol production was assessed in two different ways, as shown in Figure 9. Productivity (Fig. 9a) would give an insight into the potential large-scale applications of the proposed process since it indicates how much ethanol can be produced from a known amount of biomass, while yield (Fig. 9b) is used as a measure of how efficiently the yeast is metabolizing

sugars for ethanol production. There were no statistical differences between productivity for all pretreatment liquors, with values around 28 g of ethanol per kg of untreated biomass, even though initial sugar concentrations were different (Figure 7). After enzymatic hydrolysis, as expected, given the low sugar yields, productivity decreased; in this case, autohydrolysis

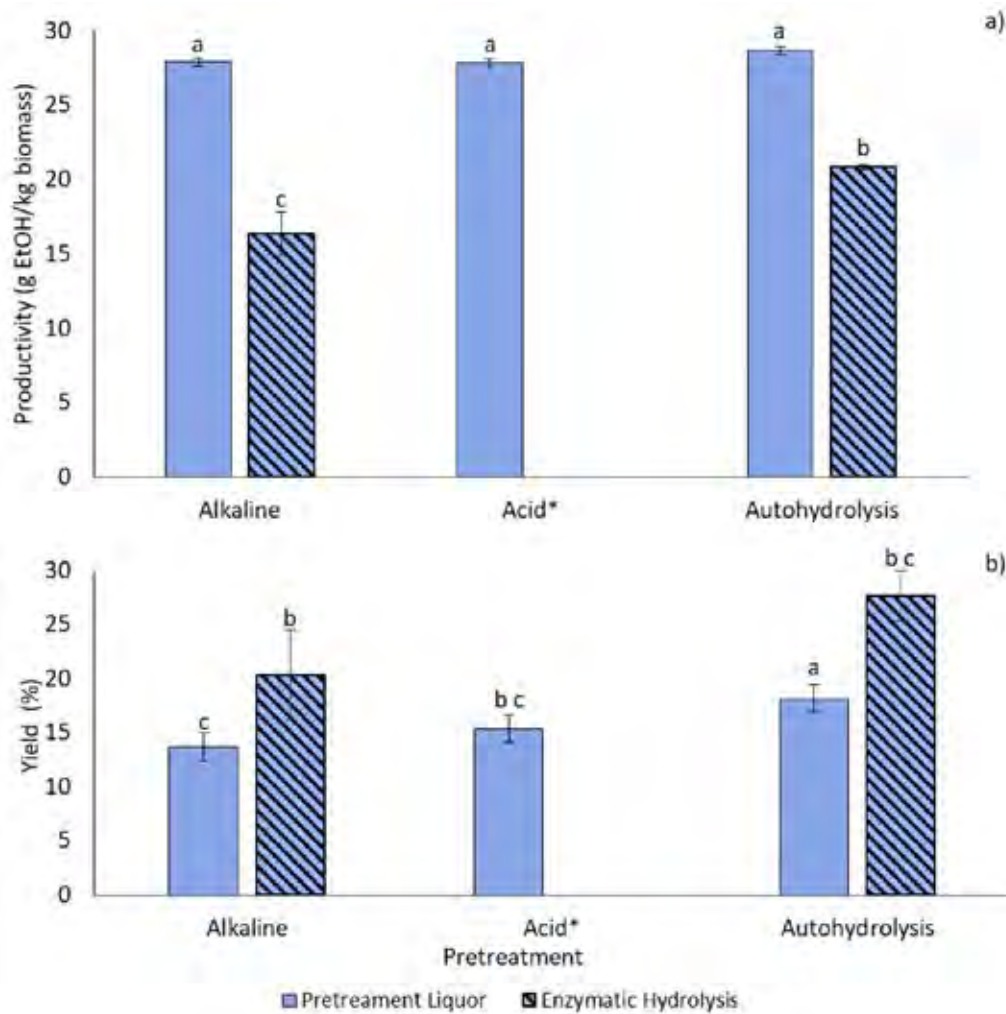


Figure 9. Bioethanol production levels reported as a) Productivity and b) yield of pretreatment liquors fermentation and enzymatic hydrolysates. * Enzymatic hydrolysis fermentation was not carried out for the acid pretreatment due to negligible initial sugar concentrations. Pretreatments with the same letters do not present significant differences.

resulted in the most massive productivity of (20.81 ± 0.14) g EtOH/kg Biomass. Nevertheless, despite having lower productivity, enzymatic hydrolysates displayed higher yield, where, again, the autohydrolysis was the most efficient, as it was also among the pretreatment liquors. For the latter, there were no differences between the liquors resulting from the acid and alkaline pretreatments.

Productivities and efficiencies obtained in this work were low in comparison to previous studies with other biomasses^{4,43}. This was expected, particularly for liquors from the acid and autohydrolysis pretreatments, given their low sugar concentrations. However, the fact that alkaline liquors had the same productivity, with sugar concentrations 3-fold from the other pretreatments, may be a sign of inhibition for ethanol production⁴¹. This is corroborated by the yield, which indicates that only up to 18% (autohydrolysis) of the available sugar is converted into ethanol. After enzymatic hydrolysis, this effect is improved, but many sugars are still not converted into ethanol.

Interestingly, these sugars are consumed. It is possible that the yeast strain used in the study was not the most appropriate one. Yeast selection is essential as cells are subjected to different stresses resulting from biomass pre-processing⁴⁴. Thus, screening should be conducted to select a yeast with higher short-term productivity.

Conclusions

The present study was a comprehensive first approximation for valorizing relevant lignocellulosic biomass in Ecuador, cocoa pod shell. Generating reducing sugars from these residues could be useful not only for bioethanol production but for other metabolites of interest, such as organic acids and lipids, among others. To achieve this goal, we have proposed using traditional pretreatment methods to understand this biomass behavior and its potential for further studies. Relatively mild pretreatments, including autohydrolysis and dilute acids and bases, significantly affect biomass composition and properties, particularly reducing lignin content significantly in alkaline conditions. However, this reduction might not be sufficient for cellulase hydrolysis under the studied conditions, and strong indications of enzymatic and bioethanol production inhibition were observed for the alkaline and acid pretreatments. Autohydrolysis appeared to have the lesser inhibition effects, and optimizing these pretreatment conditions could be beneficial for industrial applications as it would have a limited environmental impact. These results are promising for cocoa pod shell valorization, and further investigation is worth exploring.

Acknowledgments

The authors are thankful to Carolina Andino and Sebas-

tian Salazar, from the Department of Chemical Engineering, USFQ, for their guidance in proximal analysis and generating a calibration curve for ethanol quantification.

Funding Information

This work has been funded by the Collaboration Grants program at Universidad San Francisco de Quito.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest in the present work.

Bibliographic references

- Alcama J, Moreno B, Nováky M, et al. Europe. Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Clim Chang 2007 Impacts, Adapt Vulnerability Contrib Work Gr II to Fourth Assess Rep Intergov Panel Clim Chang 2007; 541–580.
- Carmona-Cabello M, Sáez-Bastante J, Pinzi S, et al. Optimization of solid food waste oil biodiesel by ultrasound-assisted transesterification. Fuel 2019; 255: 115817.
- Althuri A, Gujjala LKS, Banerjee R. Partially consolidated bioprocessing of mixed lignocellulosic feedstocks for ethanol production. Bioresour Technol 2017; 245: 530–539.
- Wei H, Yingting Y, Jingjing G, et al. Lignocellulosic Biomass Valorization: Production of Ethanol. Elsevier. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1016/B978-0-12-409548-9.10239-8.
- de Barros R da RO, Becarelli P, de Oliveira RA, et al. Triticum spelta straw hydrothermal pretreatment for the production of glucose syrups via enzymatic hydrolysis. Biochem Eng J 2019; 151: 107340.
- Mosier N, Wyman C, Dale B, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresour Technol 2005; 96: 673–686.
- Solarte-Toro JC, Romero-García JM, Martínez-Patiño JC. Acid pretreatment of lignocellulosic biomass for energy vectors production: A review focused on operational conditions and techno-economic assessment for bioethanol production. Renew Sustain Energy Rev 2019; 0–1.
- Lee S-M, Kim KH, Ko JK, et al. Ethanol production from lignocellulosic hydrolysates using engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring xylose isomerase-based pathway. Bioresour Technol 2016; 209: 290–296.
- Hama S, Kihara M, Noda H, et al. Development of cell recycle technology incorporating nutrient supplementation for lignocellulosic ethanol fermentation using industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem Eng J 2018; 137: 23–29.
- Jiang D, Hao M, Fu J, et al. Potential bioethanol production from sweet sorghum on marginal land in China. J Clean Prod 2019; 220: 225–234.
- ANECOCOA. Exportación Ecuatoriana De Cocoa - 2015 Exportación Ecuatoriana De Cocoa - 2015. Asoc Nac Export Cocoa 2015; 6p.
- Espinoza Guzman R, Albornoz Vintimilla E, Medina Palacios S. Atlas Bioenergético del Ecuador. Quito, 2014.
- Ardila C, Carreño S. Aprovechamiento de la cáscara de la mazorca de cocoa como adsorbente. Univ Ind Santander 2011; 13: 234.
- Mateus, Lady, Hernandez O, Velasquez M, et al. Evaluación del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido del pasto maralfalfa (*Pennisetum glaucum* x *Pennisetum purpureum*) para la producción de etanol. Rev Colomb Biotecnol 2012; 14: 146–156.
- Karapatsia A, Pappas I, Penloglou G, et al. Optimization of Dilute Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of *Phalaris aquatica* L. Lignocellulosic Biomass in Batch and Fed-Batch Processes. Bioenergy Res 2017; 10: 225–236.
- Larrea FA, Salazar S, Andino C, et al. comparison of bioethanol production of starches from different andean tubers. Chem Eng Trans 2020; 80: 259–264.
- First Action 1934 Final Action. Comp A J Comp Educ 1934; 577: 6155–6155.
- AOAC. AOAC Official Method 920.39. AOAC Off Methods Anal 2002; 888–898.
- Thiex N. Evaluation of analytical methods for the determination of moisture, crude protein, crude fat, and crude fiber in distillers dried grains with solubles. J AOAC Int 2009; 92: 61–73.
- Lynch JM, Barbano DM. Kjeldahl nitrogen analysis as a reference method for protein determination in dairy products. J AOAC Int 1999; 82: 1389–1392.
- Domínguez-Domínguez MM, Álvarez-Castillo A, Granados-Baeza M, et al. Estudio de la cinética del pretatamiento e hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar. Iberoam Polim 2012; 13: 200–211.
- Gusakov A V., Kondratyeva EG, Sinityn AP. Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities. Int J Anal Chem 2011; 2011: 1–4.
- Campos-Vega R, Nieto-Figueroa KH, Oomah BD. Cocoa (*Theobroma cocoa* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. Trends Food Sci Technol 2018; 81: 172–184.
- Han X, Bao J. General Method to Correct the Fluctuation of Acid Based Pretreatment Efficiency of Lignocellulose for Highly Efficient Bioconversion. ACS Sustain Chem Eng 2018; 6: 4212–4219.
- Alvarez-Barreto JF, Quintero D, Rodríguez M, et al. Evaluation of phenolic compounds, lignin, amino acids and carbohydrates in theobroma cocoa L. From three different climate regions in venezuela. Emirates J Food Agric 2018; 30: 522–530.
- Mahmood H, Moniruzzaman M, Iqbal T, et al. Recent advances in the pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and value-added products. Curr Opin Green Sustain Chem. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1016/j.cogsc.2019.08.001.
- Zheng Y, Zhao J, Xu F, et al. Pre-treatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. Progress in Energy and Combustion Science 2014; 42: 35–53.
- Abraham A, Mathew AK, Park H, et al. Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. Bioresour Technol 2020; 301: 122725.
- Sun S, Cao X, Sun S, et al. Improving the enzymatic hydrolysis of thermo-mechanical fiber from *Eucalyptus urophylla* by a combination of hydrothermal pretreatment and alkali fractionation. Biotechnol Biofuels 2014; 7: 1–12.
- Zeng M, Ximenes E, Ladisch MR, et al. Tissue-specific biomass recalcitrance in corn stover pretreated with liquid hot-water: SEM imaging (part 2). Biotechnol Bioeng 2012; 109: 398–404.
- Lin YS, Lee WC, Duan KJ, et al. Ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation in rotary drum reactor using thermotolerant *Kluyveromyces marxianus*. Appl Energy 2013; 105: 389–394.
- Dávila I, Gullón P, Labidi J, et al. Assessment of the influence of the temperature in the microwave-assisted alkaline delignification of vine shoots. Chem Eng Trans 2018; 70: 1687–1692.
- Sangian HF, Pangau JR, Tamuntuan GH, et al. The structural analysis of the lignocellulose, champaca timber (*Elmerrillia ovalis*) modified by the microwave. Chem Eng Trans 2018; 65: 229–234.
- Pupiales B, Galeas S, Guerrero V, et al. generation of porous scaffolds from cocoa mesocarp for biomedical applications using surface response methodology. Chem Eng Trans 2020; 79: 151–156.
- Poletto M, Pistor V, Santana RMC, et al. Materials produced from plant biomass. part II: Evaluation of crystallinity and degradation kinetics of cellulose. Mater Res 2012; 15: 421–427.
- Almeida EAMS, Facchi SP, Martins AF, et al. Synthesis and characterization of pectin derivative with antitumor property against Caco-2 colon cancer cells. Carbohydr Polym 2015; 115: 139–145.
- Diaz AB, Moretti MM de S, Bezerra-Bussoli C, et al. Evaluation of microwave-assisted pretreatment of lignocellulosic biomass immersed in alkaline glycerol for fermentable sugars production. Bioresour Technol 2015; 185: 316–323.
- Kim JS, Lee YY, Kim TH. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. Bioresour Technol 2016; 199: 42–48.
- Lorenci Woiciechowski A, Dalmas Neto CJ, Porto de Souza Vandenbergh L, et al. Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances. Bioresource Technol 2020; 304: 122848.

40. Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 2009; 48: 3713–3729.
41. Singh B, Kumar P, Yadav A, et al. degradation of fermentation inhibitors from lignocellulosic hydrolysate liquor using immobilized bacterium, *Bordetella* sp. BTIITR. *Chem Eng J* 2019; 361: 1152–1160.
42. Kim Y, Ximenes E, Mosier NS, et al. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme Microb Technol* 2011; 48: 408–415.

43. Guigou M, Cabrera MN, Vique M, et al. Combined pretreatments of eucalyptus sawdust for ethanol production within a biorefinery approach. *Biomass Convers Biorefinery* 2019; 9: 293–304.
44. Kumari R, Pramanik K. Improvement of multiple stress tolerance in yeast strain by sequential mutagenesis for enhanced bioethanol production. *J Biosci Bioeng* 2012; 114: 622–629.

Received: 25 October 2020

Accepted: 20 November 2020



RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Líquenes como biosensores para la evaluación de contaminación atmosférica urbana y sub urbana en un valle de montaña tropical, Rionegro, Antioquia

Lichens as biosensors for the evaluation of urban and sub-urban air pollution in a tropical mountain valley, Rionegro, Antioquia

Mario Alberto Quijano Abril¹, Diana Marcela Ramírez Ospina², María Isabel Domínguez Rave³, James Londoño Valencia⁴

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.10

Resumen: Se realizó un estudio con el objetivo de evaluar la calidad del aire usando líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica. El estudio se realizó en el municipio de Rionegro, Colombia, a una altura de 2130 msnm, en 19 localidades agrupadas en 7 grandes zonas, que representan áreas urbanas con actividades generadoras de contaminación del aire y áreas sub-urbanas con pocas o ninguna fuente de contaminación. Para el área de estudio se calculó el índice de pureza atmosférica (IPA), el cual fue obtenido en función del número de especies de líquenes encontrados y de su frecuencia en la localidad monitoreada con esta información se realizó un mapa bidimensional de zonas de isocontaminación. La identificación taxonómica de los líquenes se realizó mediante comparación con especímenes de herbario y cortes histológicos. En total fueron encontrados 354 líquenes agrupados en 25 familias, 53 géneros y 126 especies. Las familias de líquenes mejor representadas con base al muestreo realizado fueron: *Parmeliaceae*, *Physciaceae* y *Graphidaceae*; asimismo, fueron encontrados 95 forofitos agrupados en 36 especies, 31 géneros y 21 familias. Se evidenció para las zonas con mayor contaminación, el hábito de crecimiento de los líquenes era costroso y folioso y para las de menor contaminación, era fruticoso. Los resultados del presente análisis de biosensores son congruentes con los obtenidos en la medición con equipos convencionales, por lo cual este método representa una fuente eficaz y económica para evaluar los niveles de contaminación en centros urbanos.

Palabras clave: Líquenes, Biosensores, Contaminación atmosférica, Índice de Pureza Atmosférica IPA.

Abstract: A study was carried out with the objective of evaluating air quality using lichens as bioindicators of atmospheric pollution. The study was carried out in the municipality of Rionegro, Colombia, at an altitude of 2,130 meters above sea level, in 19 localities grouped into 7 large areas, representing urban areas with activities that generate air pollution and sub-urban areas with few or no sources of air pollution. In the study area, the atmospheric purity index (IPA) was calculated, which was obtained based on the number of lichen species found and their frequency in the monitored location with this information, a two-dimensional map of ice-contamination zones were made. The taxonomic identification of the lichens was carried out by comparison with herbarium specimens and histological sections. In total, 354 lichens were found grouped into 25 families, 53 genera and 126 species. The best represented families of lichens based on the sampling carried out were: *Parmeliaceae*, *Physciaceae* and *Graphidaceae*; Likewise, 95 profits were found grouped into 36 species, 31 genera and 21 families. It was evidence that the areas with greater contamination, the growth habit of lichens was crusty and folious and for those with less contamination, it was fruticose. The results of the present analysis of biosensors are consistent with those obtained in the measurement with conventional equipment, therefore this method represents an efficient and economical source to evaluate the levels of contamination in urban centers.

Key words: Lichens, biosensors, air pollution, Index of Atmospheric Purity IAP.

Introducción

La contaminación del aire urbano genera problemas de salud pública, daño a ecosistemas naturales, así como, afectaciones al mobiliario urbano existente. Esta situación es uno de los mayores desafíos que enfrentan actualmente los grandes centros urbanos. Estudios realizados en Colombia han demostrado que en los últimos años la mayor contaminación del aire se presenta en el Área Metropolitana del Valle de Aburrá, teniendo en cuenta el crecimiento desenfrenado y desordenado dado en la última década¹. En el año 2016 el Sistema de Alerta Temprana de Medellín y el Valle de Aburrá (SIATA), declara históricamente la alerta naranja en el área Metropolitana debido a la elevada acumulación de partículas contaminantes PM_{2.5} en la atmósfera, lo cual inicia una serie de estrategias para mitigar este fenómeno y deja en entre dicho la planificación y el control de emisiones contaminantes². El monitoreo

de la contaminación del aire cada vez es más necesario, sin embargo, implica un gran esfuerzo económico y logístico, el cual muchos municipios y áreas en vías de desarrollo no pueden costear.

Según el IDEAM³ en Colombia se contaba con 26 sistemas de vigilancia de la calidad del aire, los cuales sumaron 204 estaciones de monitoreo principalmente de contaminantes criterio. La cobertura espacial de estos sistemas de vigilancia abarcó 91 regiones entre ciudades y centros poblados. La evaluación de los contaminantes criterio se ha venido realizando mediante la implementación de métodos estandarizados que incluyen sensores manuales, automáticos y semiautomáticos, e incluso la mezcla de varios de estos.

Rionegro es uno de los municipios con mayor crecimiento en el país, donde diferentes aspectos como su calidad de vida

¹ Director del grupo de estudios florísticos, programa de Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingeniería, Universidad Católica de Oriente, Rionegro, Colombia.

² Ingeniera ambiental, Universidad Católica de Oriente, Rionegro, Colombia.

³ Grupo de Investigación Unidad de Biotecnología, Universidad Católica de Oriente, Rionegro, Colombia.

⁴ Grupo de Limnología y Recursos hídricos, Facultad de Ingeniería, Universidad Católica de Oriente.

y cercanía estratégica a Medellín han influido en una constante migración de residentes y empresas, las cuales han influido directamente en el deterioro de las condiciones del aire. A estos factores se suma la fundación en el año 1985 del Aeropuerto José María Córdova, el segundo más importante del país con una capacidad de 205.000 operaciones al año y que actualmente se está ampliando⁴. Estos fenómenos han llevado a la implementación de medidas que nunca antes se habían tomado por parte de la administración municipal, como la implementación del día sin carro y diferentes campañas que buscan disminuir el flujo vehicular. A pesar de esta problemática el municipio no cuenta con un sistema de alerta y monitoreo que permita un adecuado y constante control de la calidad del aire.

El cambio climático y la contaminación atmosférica son las principales amenazas para el mantenimiento de la salud ambiental y de las zonas ecológicas estratégicas, es por esto que se hace necesario una forma eficaz y de bajo costo que mida los efectos de esas amenazas. Los líquenes constituyen un sensor natural o bioindicador que puede ser utilizado en la vigilancia de la salud ambiental a largo plazo como la respuesta a la contaminación atmosférica^{5,6}.

La estimación de la calidad del aire local a partir de concentraciones elementales en líquenes o musgos que crecen de forma natural in situ es una técnica clásica^{7,8} con amplio uso actual para completar el costoso monitoreo de instrumentos⁹. Un indicador es un medio del que dispone el hombre para observar con sus sentidos en un tiempo breve un fenómeno que escapa a su percepción normal¹⁰. Una primera aproximación a la idea de lo que es un bioindicador puede encontrarse en la observación del comportamiento de algunas plantas y animales ante ciertos cambios atmosféricos¹¹.

Entre los más comunes bioindicadores reportados mundialmente ya sea por su sensibilidad a los contaminantes o por su resistencia a la acumulación de los mismos se encuentran los líquenes. Los líquenes son una asociación simbiótica entre un hongo y uno o más organismos autótrofos fotosintéticos, que puede ser un alga verde o una cianobacteria¹². Estos organismos se conocen por su sensibilidad a la contaminación del aire y especialmente por la estrecha relación entre número, abundancia y diversidad de especies con respecto a la presencia de diferentes contaminantes atmosféricos¹³. Estudios más detallados como los de Amman *et al.*¹⁴, muestran que los líquenes pueden ser utilizados como biomonitores de contaminación si se dispone de adecuada información sobre diferentes sustancias transportadas en el aire durante periodos de tiempo constantes, manteniendo esa idea, Alzate¹⁵ sostiene que la implementación de líquenes como biosensores, se convierte en una estrategia asequible y puede responder diferentes preguntas sobre la calidad del aire. Desde 1970 LeBlanc y De Sloover¹⁶ propusieron una metodología para el diagnóstico de la calidad del aire usando líquenes como bioindicadores y calculando un índice llamado Índice de Pureza Atmosférica (IPA), el cual es un número relacionado directamente con la riqueza de la vegetación, entonces, la vegetación de epifitas está relacionada con la calidad del aire; indicador que ha sido ampliamente utilizado en otros estudios como los propuestos por Udeni *et al.*¹⁷, Agnan *et al.*¹⁸, Troy *et al.*¹⁹ y Lijteroff *et al.*²⁰.

En Colombia, diferentes estudios realizados con bioindicadores se centran en la calidad del agua con especies indicadoras de macro-invertebrados y peces²¹, sin embargo, también se registran estudios con líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica en algunos departamentos del país como Boyacá, Antioquia y Cundinamarca^{22,23,24}. Para el departamento de Antioquia los trabajos con líquenes se registran solo para valle de Aburra y su área Metropolitana^{22,25}. En el

municipio de Rionegro actualmente no se conoce ningún trabajo publicado al respecto que pueda servir como herramienta para las corporaciones ambientales regionales. Quizá los únicos acercamientos para medir la calidad del aire se han basado en monitoreos de las emisiones generadas por fuentes fijas.

En este trabajo se busca delimitar zonas de isocontaminación en el municipio de Rionegro. Para esto se utilizaron variables como la abundancia y distribución de biosensores líquenicos. Asimismo, se propone el primer listado ilustrado de la liquenoflora presente en las zonas urbanas y rurales del área de estudio.

Materiales y métodos

Área de estudio

Rionegro se encuentra ubicado en la cordillera central de los andes colombianos, a una altura de 2130m sobre el nivel del mar y dentro del valle llamado San Nicolás. Rionegro tiene una extensión de aproximadamente 200 km², un clima frío con una precipitación promedio anual de 2160 mm y una temperatura media anual de 17°C²⁶. Fueron seleccionadas diferentes zonas del municipio de Rionegro teniendo en cuenta una presencia representativa de actividad industrial, así como alto tránsito vehicular; adicionalmente, se escogió una zona donde la presencia de estas actividades fuera escasa para utilizarla como área de referencia. Para dicho propósito, se tomaron muestras en un área de reserva forestal ubicada en la misma zona de vida del municipio Rionegro y cercano a este, en el municipio de El Carmen de Viboral (Figura 1).

Selección de los forófitos para el monitoreo

Se realizó una inspección previa en las zonas seleccionadas con el fin de determinar los niveles de cobertura vegetal y seleccionar las especies de forófitos (sustratos para las comunidades de líquenes). Para el muestreo se siguieron las propuestas realizadas por García y Rubiano²⁷, quienes sugieren incluir individuos adultos y sanos, con un mínimo de 50cm de perímetro. Se excluyeron del análisis los árboles inclinados, en estado fitosanitario deficiente, pintados o de corteza lisa. Se seleccionaron 5 especies de forófitos por localidad, para un total de 95 árboles muestreados.

Muestreo de los líquenes

Para el muestreo de líquenes se utilizó la metodología propuesta por Amman *et al.*¹⁴, con las modificaciones realizadas por Nimis *et al.*²⁸, quienes sugieren la utilización de una red de muestreo de 30 x 50 cm, compuesta por 10 cuadrantes de 10 x 15 cm cada uno. Dicha red se situó sobre la zona del tronco con mayor densidad líquénica, a una altura no inferior a 120 cm del suelo y posteriormente se registró la frecuencia de cada especie en la red de muestreo, mínimo 1 y máximo 10 cuadrantes.

Delimitación de zonas de isocontaminación

Para el cálculo del índice de pureza atmosférica (IPA) de cada estación se sumaron las frecuencias de todas las especies presentes en la red de muestreo y se dividió entre el número de forófitos muestreados en dicha estación según la ecuación 1, propuesta por LeBlanc y De Sloover¹⁶ y modificada por Rubiano y Chaparro²³, de acuerdo a la ecuación 1.

$$IPA_j = \sum_{i=1:n} \frac{Q_i * f_i * C_i}{n} \quad (1)$$

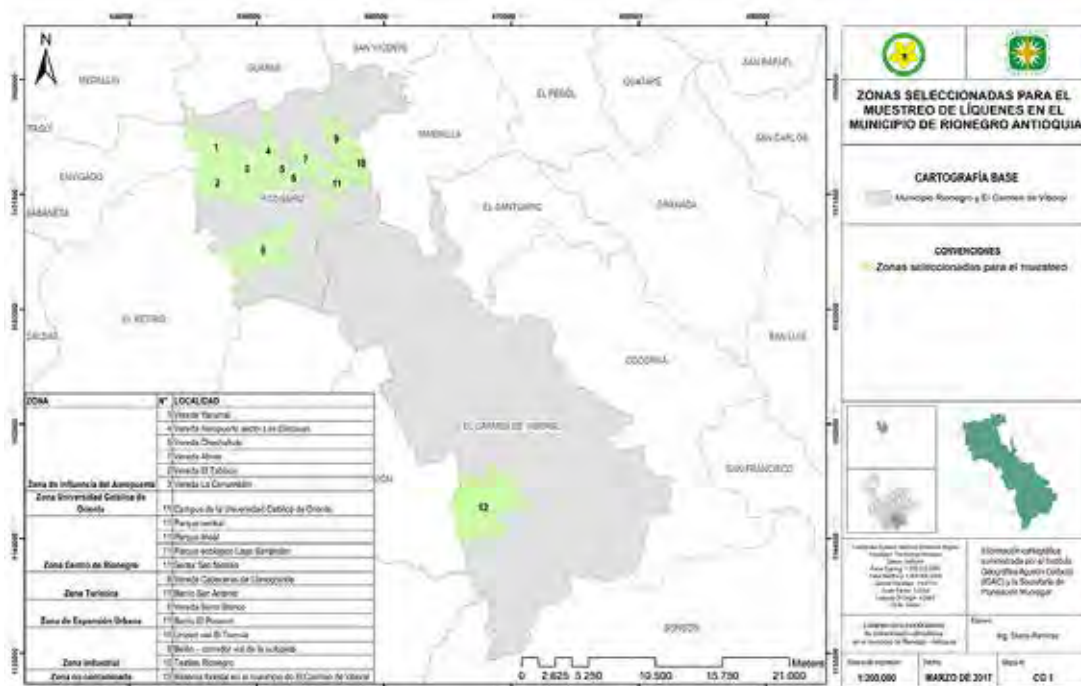


Figura 1. Zonas seleccionadas para muestreo de líquenes en los municipios Rionegro y El Carmen de Viboral

Donde IPA es el Índice de Pureza Atmosférica para cada zona j , n es el número de unidades muestreadas para cada zona j , Q es el factor medio de resistencia en función de la riqueza del género o especie i encontrada (grado de sensibilidad), f es la frecuencia de cada especie i (número de forofitos de la especie i en la zona j) y C en la cobertura relativa del líquen de la especie i en la zona j .

Posteriormente se realizó la marcación de polígonos sobre el mapa del municipio, donde se agruparon las localidades con similitud en la influencia de contaminantes, teniendo como referencia las zonas de muestreo. La tabla 1 presenta los rangos IPA y su correspondiente clasificación de la calidad del aire. Para la identificación de las zonas de isocontaminación, se definieron valores del IPA desde 36 a 79,4 de acuerdo a lo propuesto por Fernández *et al.*²⁹. La representación cartográfica se realizó en el programa ArcGis versión 10.4, donde se ubicaron las localidades de muestreo georreferenciadas, a partir de las cuales se generaron los polígonos de áreas de isocontaminación mediante la interpolación IDW (Inverse Distance Weighting por su sigla en inglés), según la ecuación 2.

$$Z(S_0) = \sum_{i=1}^N \lambda_i * Z(S_i) \quad (2)$$

En el cual $Z(S_0)$ es el valor a predecir, N es el número de muestras alrededor del punto a predecir, λ_i son los pesos asignados a cada punto vecino y $Z(S_i)$ son los valores medidos.

Clase líquénica	Zona	Intervalo del IPA	Calidad del aire
A (Supervivencia líquénica)	I	36 ≤ IPA < 42	Muy baja
		42 ≤ IPA < 48	Baja
B (Transición de comunidades)	II	48 ≤ IPA < 54	Baja – Moderada
		54 ≤ IPA < 60	Moderada
C (Flora seminatural)	III	60 ≤ IPA < 66	Moderada – Alta
		66 ≤ IPA < 72	Alta
D (Flora natural)	IV	72 ≤ IPA	Muy alta

Tabla 1. Clases líquénicas, calidad del aire y equivalencia con diferentes intervalos del IPA. Adaptado de Fernández *et al.*²⁹.

Identificación taxonómica

La identificación taxonómica se realizó utilizando la metodología propuesta por Goward³⁰, donde expone los siguientes pasos para la identificación del líquen: a) comparación con especímenes de herbario previamente identificados y b) cortes histológicos a mano alzada o micrótopo de congelación para conocer la forma y tamaño de las esporas, grosor del himenio en los apotecios, espesor de los estratos talinos (corteza superior e inferior, estrato del fitobionte, estrato medular).

Resultados y discusión

Se realizó el monitoreo en 19 localidades distribuidas en el municipio de Rionegro y una de ellas en el municipio de El Carmen de Viboral y como se mencionó anteriormente fue utilizada como zona de referencia, debido a la baja contaminación del área en la reserva forestal. Las especies de forofitos sobre los cuales se trabajó se pueden observar en la tabla 2.

Composición florística

Se registraron y evaluaron un total de 95 forofitos agrupados en 36 especies, 31 géneros y 21 familias. Las familias mejor representadas con base en el muestreo realizado fueron: *Euphorbiaceae*, *Bignoniaceae* y *Arecaceae*. Entre los géneros más abundantes se destacan *Croton* con 12 individuos, *Acacia* con 9 individuos y *Archontophoenix* con 8 individuos. La especie más

Zona	Localidad	Forofito
Zona de influencia Aeropuerto	Vereda Yartunal	EUPHORBIACEAE <i>Croton magdalenensis</i> (3 forofitos muestreados)
		URTICACEAE <i>Cecropia teleitida</i>
		HYPERICACEAE <i>Vismia baccifera</i>
	Vereda Aeropuerto - Zona Cárcavas	FABACEAE <i>Acacia melanoxylon</i> (2 forofitos muestreados)
		ERICACEAE <i>Cavendishia pubescens</i> (2 forofitos muestreados)
	Vereda Chachafrito	EUPHORBIACEAE <i>Croton magdalenensis</i> (2 forofitos muestreados)
LAURACEAE <i>Persea americana</i>		
FABACEAE <i>Erythrina edulis</i>		
MYRTACEAE <i>Myrcia popayanensis</i>		
Vereda Abreo	ACANTHACEAE <i>Trichanthera gigantea</i> (2 forofitos muestreados)	
	MYRTACEAE <i>Eucalyptus globulus</i>	
	FABACEAE <i>Acacia melanoxylon</i> y <i>Acacia decurrens</i>	
Vereda El Tablazo	BIGNONIACEAE <i>Tecoma</i> sp.	
	FAGACEAE <i>Quercus humboldtii</i>	
	ARECACEAE <i>Archontophoenix cunninghamiana</i> (2 forofitos muestreados)	
	EUPHORBIACEAE <i>Croton magdalenensis</i>	
Vereda La Convención	CLETHRACEAE <i>Clethra fogifolia</i> (5 forofitos muestreados)	
	EUPHORBIACEAE <i>Croton magdalenensis</i> (2 forofitos muestreados)	
Zona Universidad Católica de Oriente	FABACEAE <i>Acacia decurrens</i>	
	ARECACEAE <i>Archontophoenix cunninghamiana</i> (2 forofitos muestreados)	
Zona Centro de Rionegro	Parque central	MAGNOLIACEAE <i>Magnolia grandiflora</i>
		FABACEAE <i>Acacia decurrens</i> y <i>Erythrina edulis</i>
		ARECACEAE <i>Archontophoenix cunninghamiana</i> (2 forofitos muestreados)
	Parque lineal	OLEACEAE <i>Fraxinus chinensis</i> (3 forofitos muestreados)
		FABACEAE <i>Erythrina edulis</i> y <i>Acacia melanoxylon</i>
Parque ecológico Lago Santander	PODOCARPACEAE <i>Retrophyllum rospigliosii</i>	
	ARECACEAE <i>Corypha umbraculifera</i> (2 forofitos muestreados) y <i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	
	FABACEAE <i>Erythrina edulis</i>	
Sector San Nicolás	MYRTACEAE <i>Eugenia biflora</i> y <i>Myrcia popayanensis</i>	
	LYTHRACEAE <i>Lafouensia acuminata</i> (2 forofitos muestreados)	
	FABACEAE <i>Ormosia</i> sp.	
Zona turística	Vereda Cabeceras de Llanogrande	JUGLANDACEAE <i>Juglans neotropica</i>
		FABACEAE <i>Acacia decurrens</i> y <i>Erythrina edulis</i>
		FABACEAE <i>Albizia carbonaria</i> (2 forofitos muestreados)
	Barrio San Antonio	MYRTACEAE <i>Eugenia myrtifolia</i>
EUPHORBIACEAE <i>Croton magdalenensis</i>		
FABACEAE <i>Tephrosia</i> sp.		
Zona de expansión urbana	Barrio El Porvenir	BIGNONIACEAE <i>Spathodea campanulata</i> y <i>Tabebuia chrysantha</i>
		BIGNONIACEAE <i>Spathodea campanulata</i> (2 forofitos muestreados)
	Vereda Barro Blanco	MYRTACEAE <i>Eugenia biflora</i>
		BIGNONIACEAE <i>Tabebuia chrysantha</i> (2 forofitos muestreados)
BIGNONIACEAE <i>Spathodea campanulata</i>		
Zona industrial	Unidad vial El Tranvía	MELIACEAE <i>Cedrela montana</i>
		LYTHRACEAE <i>Lafouensia acuminata</i> (2 forofitos muestreados)
		MALVACEAE <i>Dombeya burgessiae</i>
	Belén-corredor vial de la autopista	BIGNONIACEAE <i>Tabebuia chrysantha</i>
		EUPHORBIACEAE <i>Croton magdalenensis</i>
	Sector Textiles Rionegro	OLEACEAE <i>Fraxinus chinensis</i> (2 forofitos muestreados)
		FABACEAE <i>Acacia melanoxylon</i>
BIGNONIACEAE <i>Spathodea campanulata</i>		
FABACEAE <i>Senna pistaciifolia</i> (3 forofitos muestreados)		
MYRTACEAE <i>Eucalyptus robusta</i>		
Reserva forestal en el municipio de El Carmen de Viboral	URTICACEAE <i>Cecropia teleitida</i>	
	OLEACEAE <i>Fraxinus chinensis</i>	
	ARECACEAE <i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	
	EUPHORBIACEAE <i>Croton magdalenensis</i>	
Zona no contaminada	Reserva forestal en el municipio de El Carmen de Viboral	BIGNONIACEAE <i>Spathodea campanulata</i>
		ASTERACEAE <i>Baccharis lanifolia</i> (2 forofitos muestreados)
		BETULACEAE <i>Alnus acuminata</i> (3 forofitos muestreados)

Tabla 2. Especies de forofitos seleccionados para el muestreo de líquenes.

representativa en las estaciones de monitoreo fue *Croton magdalenensis* Müll. Arg presentándose en 8 de las 19 localidades, seguido por *Archontophoenix cunninghamiana* H. Wendl. & Drude y *Erythrina edulis* Triana ex Micheli presentes en 5 de las 19 localidades cada una. El hábito de crecimiento de las especies encontradas corresponde en su totalidad a arbóreo.

25 familias, 53 géneros y 126 especies. Las familias mejor representadas con base al muestreo realizado fueron: *Parmeliaceae*, *Physciaceae* y *Graphidaceae* (Figura 2). Entre los géneros más abundantes se destacan *Parmotrema* con 13 especies, *Usnea* con 11 y *Graphis* con 6 especies (Figura 3). Respecto a los hábitos de crecimiento, se encontró que los más abundantes eran folioso con 46 especies y crustáceo con 41, seguido de fruticuloso con 19 (Figura 4).

Composición líquénica

Se registraron un total de 354 individuos agrupados en

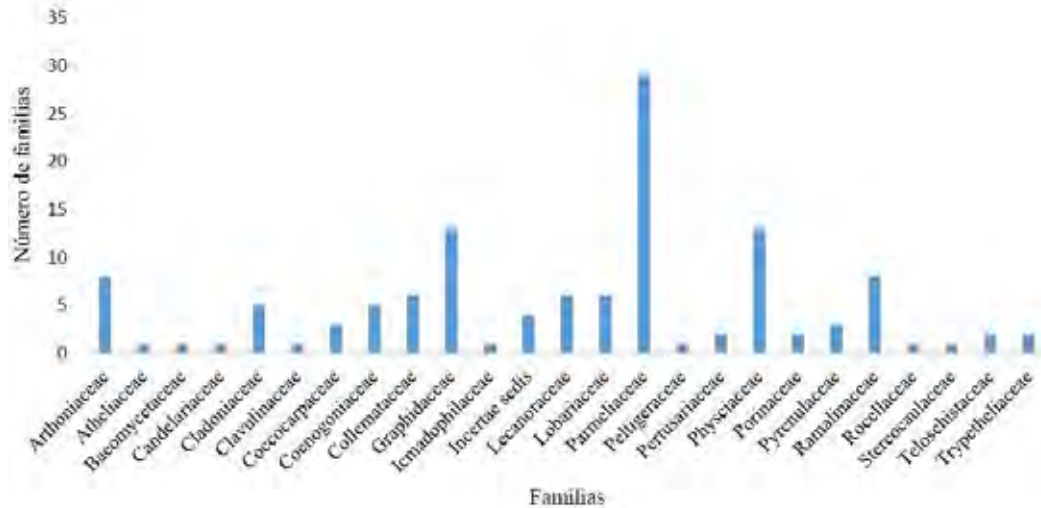


Figura 2. Composición líquénica por familias.

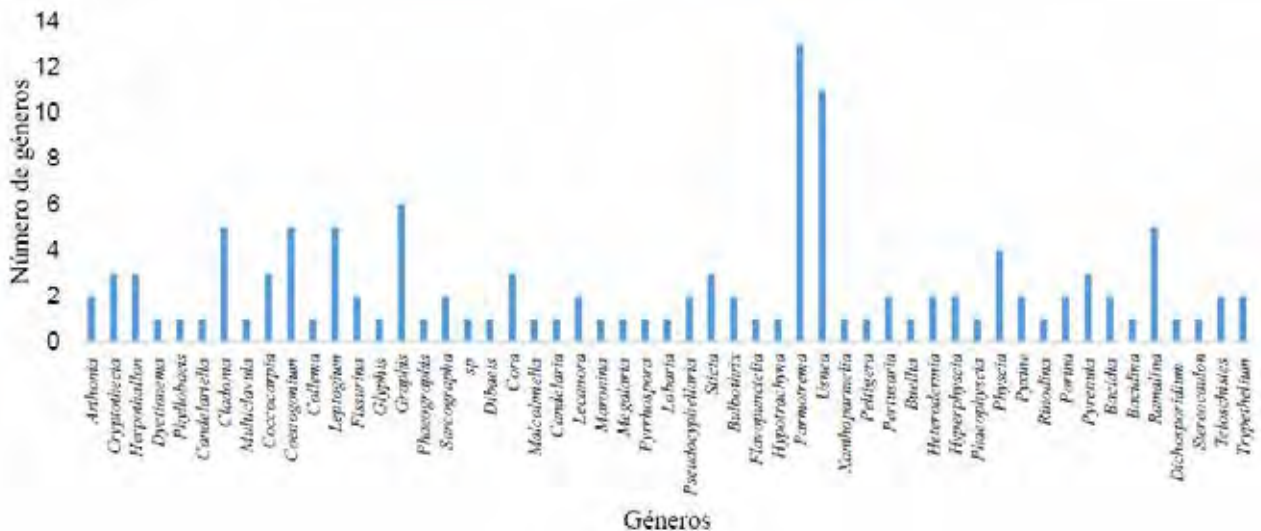


Figura 3. Composición líquénica por géneros.

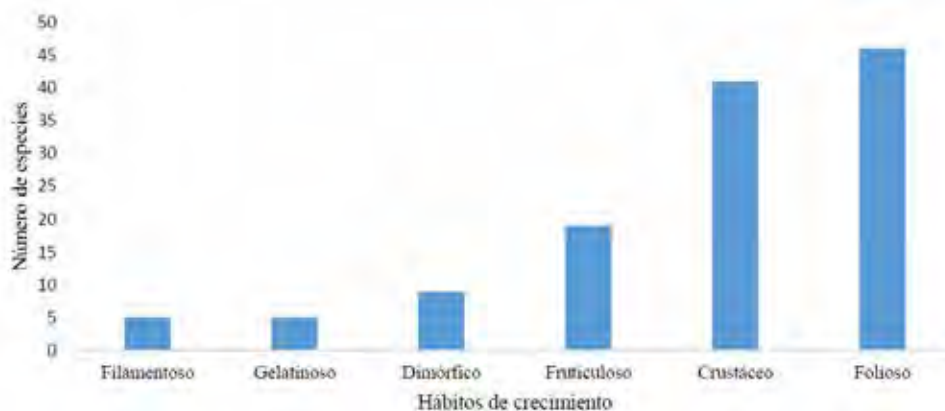


Figura 4. Composición líquénica por hábitos de crecimiento.

Zonas de isocontaminación

De acuerdo a las características de los puntos de toma de muestra, fueron definidas 7 zonas de isocontaminación que son presentadas en la tabla 3, en cada una de las zonas definidas se observan las localidades con su respectivo intervalo del IPA y clasificación de la calidad del aire.

La autoridad ambiental en la región es la Corporación Autónoma Regional de la Cuencas de los ríos Negro y Nare – CORNARE, como parte de su misión esta velar por la protección de los recursos naturales en su jurisdicción y en ese sentido, realizan periódicamente el monitoreo de la calidad del aire en la región; una de las estaciones con información de calidad del aire obtenida con equipos convencionales y que coincide con uno de los sitios utilizados en este estudio, está ubicada en la Universidad Católica de Oriente. Los resultados encontrados se muestran en la figura 5, según Cornare^{31,32,33} arrojan que esta estación y sus alrededores cuentan con una buena calidad del aire; las concentraciones de contaminantes que se han medido continuamente los últimos años como PM₁₀ y PM_{2,5}, así también otros esporádicos como CO, O₃, SO₂ y NO₂, han presentado también concentraciones por debajo de los límites establecidos en la norma colombiana de calidad del aire, resolución 2254 de 2017³⁴ y el equivalente Índice de Calidad

del Aire – ICA, ha presentado una calidad del aire en categoría "buena". Según Cornare³¹ la Universidad Católica de Oriente se encuentra ubicada en área urbana con presencia de edificaciones, los resultados arrojados por el IPA en este estudio y el ICA, calculado por la autoridad ambiental, fueron similares en cuanto a la calidad del aire evaluada por dos métodos diferentes.

Con base en la información obtenida en el estudio a través de la cuantificación del IPA, el cual ofrece un valor numérico del nivel de contaminación atmosférica en función del número de especies de líquenes encontrados y de su frecuencia en el área muestreada, se realizó el mapa bidimensional de zonas de isocontaminación. Este mapa incluyó cada una de las localidades monitoreadas y sus respectivos valores del IPA (Figura 6).

La mayor parte de las localidades muestreadas se caracterizaron por presentar líquenes con formas de crecimiento folioso y costroso como el género *Parmotrema* (común en zonas urbanas donde la contaminación por chimeneas es mayor), las cuales pueden soportar concentraciones más altas de contaminantes en la atmósfera^{29,35}. Asimismo, con la disminución en el flujo vehicular y la actividad industrial en algunas de las localidades, el índice de pureza atmosférica fue mayor,

Intervalo IPA	Calidad del Aire	Localidades evaluadas					
36 ≤ IPA < 42	Muy baja	Cárcavas	Parque lineal	Parque central	Belén	Llanogrande	San Antonio
42 ≤ IPA < 48	Baja	San Nicolás	-	-	-	-	-
48 ≤ IPA < 54	Baja/Moderada	Vereda Abreo	Barrio El Porvenir	Vereda Barro Blanco	Textiles Rionegro	-	-
54 ≤ IPA < 60	Moderada	Vereda La Convención	-	-	-	-	-
60 ≤ IPA < 66	Moderada/Alta	Sajonia-Yarumal	Parque ecológico Lago Santander	Vereda El Tablazo	Vereda Chachafrito	-	-
66 ≤ IPA < 72	Alta	UCO	-	-	-	-	-
72 ≤ IPA	Muy Alta	Reserva Forestal	-	-	-	-	-

Tabla 3. Intervalos de isocontaminación con respecto a la calidad del aire.

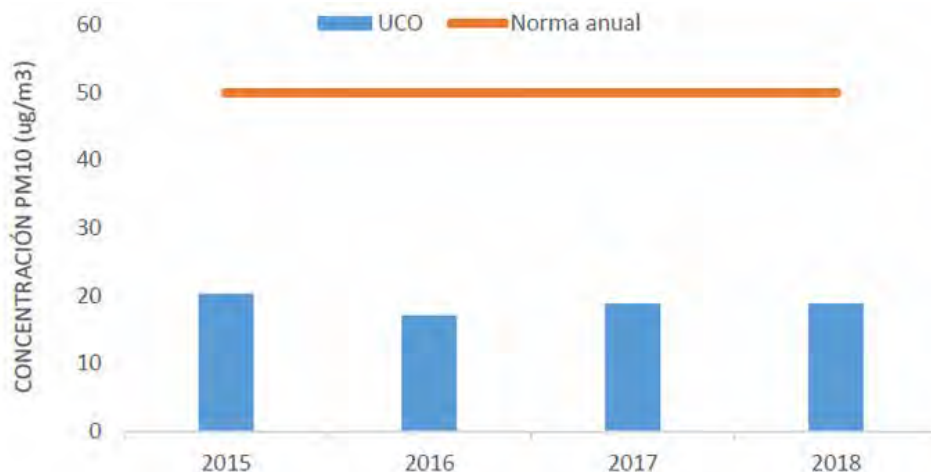


Figura 5. Concentración media anual de PM10 en la estación UCO medida por la autoridad ambiental Cornare. Adaptado de Cornare³³.

encontrándose individuos con hábitos de crecimiento fruticoso como los géneros *Usnea* y *Ramalina*, los cuales requieren niveles más bajos de contaminación para poder desarrollarse correctamente³⁵.

En las localidades con mayor contaminación, las poblaciones de líquenes mostraban daños morfológicos evidentes como cambio en la coloración, disminución de la cobertura, así como abundancia y diversidad (Figuras 7 y 8). Este cambio morfológico se debe principalmente a que los líquenes absorben y acumulan diversas sustancias presentes en el ambiente, la acumulación de estas sustancias y su imposibilidad de excretarlas retarda su crecimiento, dificulta su reproducción y puede provocarles en la mayoría de ocasiones la muerte^{22,36}.

Las zonas monitoreadas donde la calidad de aire oscila entre muy baja a baja - moderada, se caracterizaron por presentar una alta influencia de industrias y un denso tránsito vehicular, así como actividades mineras en algunas de ellas, además de esto se observó poca cobertura boscosa y grandes proyectos urbanísticos, a medida que la calidad del aire aumentaba se podía apreciar la disminución en cuanto a la influencia de industrias, además del aumento en la cobertura boscosa. La mayoría de las zonas monitoreadas presentaron calidad del aire de muy baja a baja - moderada, sin embargo, se debe tener en cuenta que son sitios donde la dispersión de los contaminantes se dificulta debido a las edificaciones.

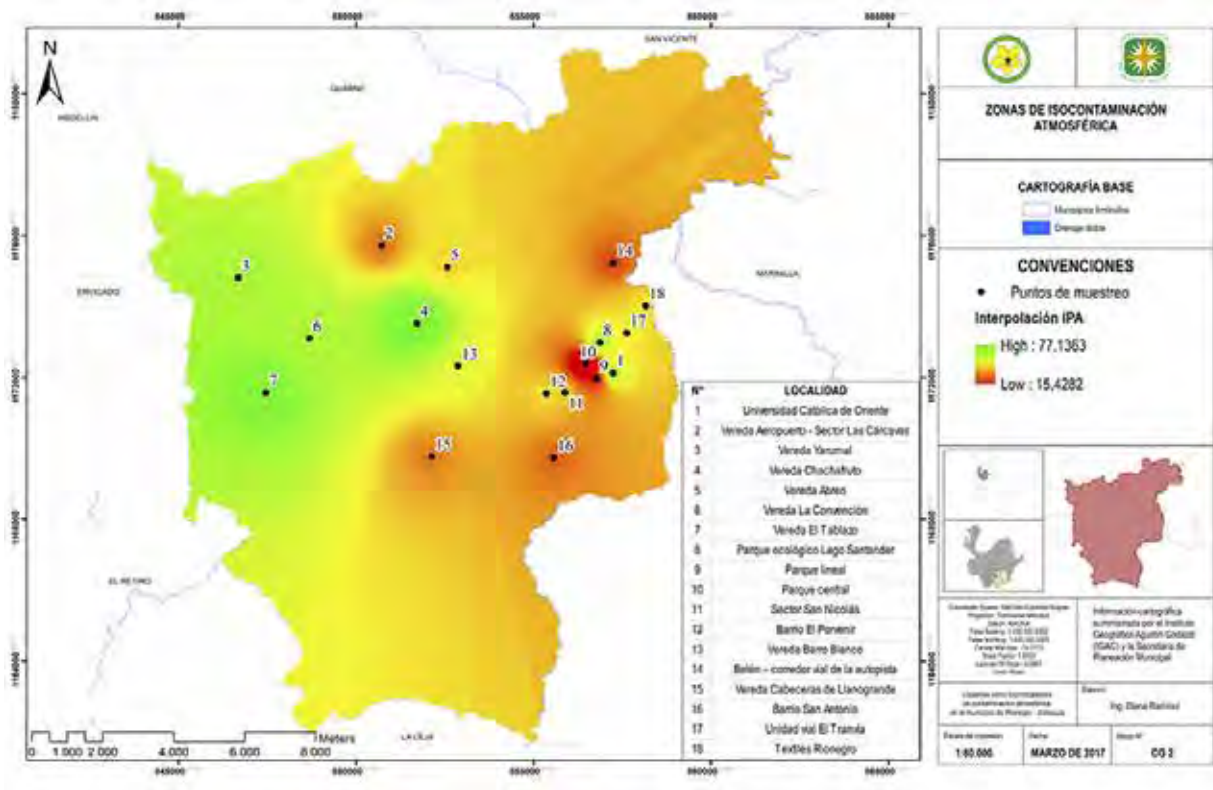


Figura 6. Mapa de isocontaminación de las zonas muestreadas (IPA).



Figura 7. Cambios en la coloración de líquenes debidos a efectos contaminantes presentes en la atmósfera.



Figure 8. Disminución de la cobertura, abundancia y diversidad líquénica. A. Forófito muestreado en la reserva forestal en el municipio de El Carmen de Viboral. B. Forófito muestreado en la localidad vereda Abreo.

Conclusiones

La contaminación de la atmósfera afecta a muchas comunidades, especialmente a las que viven en lugares industrializados y con un denso tránsito vehicular, es por esta razón que es de vital importancia realizar estudios de análisis de calidad del aire, con el fin que las personas con mayor vulnerabilidad no se vean afectadas y realizar vigilancia y control a las emisiones de contaminantes arrojados a la atmósfera para que se puedan reducir las inmisiones de los mismos.

Es de vital importancia generar alternativas para el estudio de la calidad del aire en una región que sean de fácil acceso y bajo costo. Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio es factible considerar a los líquenes como una excelente herramienta para tal propósito, pues se comprobó su sensibilidad al efecto negativo de contaminantes presentes en la atmósfera en cuanto a su abundancia, diversidad y frecuencia, además de que pueden ser encontrados en gran diversidad de ambientes lo que facilita su uso.

El uso de líquenes permite evaluar constantemente la calidad del aire en una localidad, diferente a un equipo de medición que lo hace de forma periódica; es por esto que una de las mayores potencialidades de estos organismos es que actúan como monitores continuos en el tiempo.

Con la metodología aplicada se lograron delimitar 7 zonas de isocontaminación en las que se dividieron las 19 localidades monitoreadas. Las zonas con menor calidad del aire correspondieron a las localidades con mayor influencia vehicular e industrial, las mismas fueron las de menor abundancia, diversidad y frecuencia líquénica. Asimismo, en las localidades que presentaron mayores índices de contaminación, se evidenció que el hábito de crecimiento de las especies de líquenes era costroso y folioso; y cuando el índice de pureza atmosférica aumentó se encontraron especies con hábito de crecimiento fruticoso.

Mediante el análisis de composición líquénica se pudieron definir áreas en las que debe priorizar la aplicación de estrategias de control para el mejoramiento de la calidad del aire con la reducción de emisiones por fuentes fijas y móviles que son las principales causantes de su deterioro.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Católica de Oriente por la financiación al desarrollo de este trabajo; a la Doctora Margarita María Jaramillo Ciro, por su apoyo en el desarrollo metodológico del trabajo y la identificación líquénica.

Referencias bibliográficas

- AMVA (2019). Actualización Inventario de emisiones atmosféricas del valle de Aburrá - año 2018. Informe técnico. Contrato de ciencia y tecnología No. 1179 de 2018.
- Sistema de Alerta Temprana de Medellín y el Valle de Aburrá (SIATA), 2016. Geoportal. Disponible en: https://siata.gov.co/siata_nuevo/. Accessed in August/2018.
- IDEAM. Informe de la Calidad del Aire en Colombia 2017. Primera Edición, Bogotá, D.C., 2018.
- Aeronáutica Civil (2017). Se mantiene el crecimiento del transporte aéreo en Colombia. Obtenido en <http://www.aerocivil.gov.co/prensa/noticias/Pages/se-mantiene-el-crecimiento-del-transporte-aereo-en-colombia.aspx>.
- Giordani P, Bruniati G, Bacaro G, Nascimbene J. 2012. Functional traits of epiphytic lichens as potential indicators of environmental conditions in forest ecosystems. *Ecol Indic.* 18:413_420.
- Will-Wolf, S., Jovan, S., & Amacher, M. C. (2017). Lichen elemental content bioindicators for air quality in upper Midwest, USA: A model for large-scale monitoring. *Ecological Indicators*, 78, 253-263. doi:10.1016/j.ecolind.2017.03.017
- Ferry, B.W., Baddeley, M.S., Hawksworth, D.L., 1973. *Air Pollution and Lichens*. University of Toronto Press, Toronto, Ontario, CA.
- Martin, M.H., Coughtrey, P.J., 1982. *Biological Monitoring of Heavy Metal Pollution*. Applied Science Publishers, London, UK.
- Donovan, G.H., Jovan, S.E., Gatzolis, D., Burstyn, I., Michael, Y.L., Monleon, V.J., Amacher, M.C., 2016. Using an epiphytic moss to identify previously unknown sources of atmospheric cadmium pollution. *Sci. Total Environ.* 569, 84-93.
- Honsberger, P. (1988). *Ecotoxicología*. Escuela Politécnica Federal de Lausanne. Suiza.
- Kohler, P. (1981). *Entender el clima*. Paris: Hachette.
- Chaparro, M. y Aguirre, J. (2002). *Hongos liquenizados*. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

13. Matthey, W., Della, E. y Wannenmacher, C. (1984). Manual práctico de ecología. Lausanne: Payot.
14. Amman, K., Herzog, R., Libendoerfer, L. y Urech, M. (1989). Multivariate correlation of deposition data of 8 different air pollutants to Swiss lichen IPA method in Biel and the Swiss plain. En: Boehm, G. y Leuschner, R. M. (Eds.). *Advances in Aerobiology: proceedings of the 3rd International Conference on Aerobiology*, August 6-9, 1986, Basel, Suiza: 401-406. Birkhauser Verlag, Basel, Boston.
15. Alzate G., F, Quijano A., M.A, Alvarez, A., & Fonnegra, R. (2015). Atmospheric pollen and spore content in the urban area of the city of Medellín, Colombia. *Hoehnea*, 42(1), 9-19. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-52/2013>
16. LeBlanc, S.C.F., De Sloover, J., 1970. Relation between industrialization and the distribution and growth of epiphytic lichens and mosses in Montreal. *Can. J. Bot.* 48 (8), 1485-1496. <https://doi.org/10.1139/b70-224>.
17. Udeni Jayalal, Soon Ok Oh, Jung Shin Park, Joo Han Sung, Sun Hee Kim & Jae-Seoun Hur (2016) Evaluation of air quality using lichens in three different types of forest in Korea, *Forest Science and Technology*, 12:1, 1-8, DOI: 10.1080/21580103.2014.1003983
18. Y. Agnan, A. Probst, N. Séjalon-Delmas. Evaluation of lichen species resistance to atmospheric metal pollution by coupling diversity and bioaccumulation approaches: A new bioindication scale for French forested areas. *Ecological Indicators*, Volume 72, 2017, Pages 99-110, ISSN 1470-160X, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.08.006>.
19. Richard Troy McMullin, Darien Ure, Matthew Smith, Harold Clapp, Yolanda F. Wiersma, Ten years of monitoring air quality and ecological integrity using field-identifiable lichens at Kejimikujik National Park and National Historic Site in Nova Scotia, Canada, *Ecological Indicators*, Volume 81, 2017, Pages 214-221, ISSN 1470-160X, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.05.069>.
20. Lijteroff, Rubén, Lima, Luis, & Prieri, Betzabé. (2009). Uso de líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica en la ciudad de San Luis, Argentina. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25(2), 111-120. Recuperado en 10 de septiembre de 2020, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992009000200006&lng=es&tlng=es.
21. Roldán G, Ramirez JJ. (2008) *Fundamentos de Limnología Neotropical*, 2a Edición. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
22. Jaramillo-Ciro, M. M. (2008). Estudio exploratorio de las posibles afectaciones de la comunidad líquénica asociadas a dos estaciones de alta y baja contaminación de la red de monitoreo de la calidad del aire del Valle de Aburrá. *Fragua*, 1, 87-105.
23. Rubiano, L. J. y Chaparro, M. (2006). Delimitación de áreas de isocontaminación atmosférica en el campus de la Universidad Nacional de Colombia mediante el análisis de bioindicadores (líquenes epífitos). Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.
24. Simijaca, D. F., Vargas, D. L. y Morales, M. E. (2014). Uso de organismos vegetales no vasculares como indicadores de contaminación atmosférica urbana (Tunja, Boyacá, Colombia). *Acta biológica colombiana*, 19, 221-232.
25. Correa-Ochoa, M. A., Vélez-Monsalve, L. C., Saldarriaga-Molina, J. C., & Jaramillo-Ciro, M. M. (2020). Evaluation of the Index of Atmospheric Purity in an American tropical valley through the sampling of corticolous lichens in different phorophyte species. *Ecological Indicators*, 115, 106355. doi:10.1016/j.ecolind.2020.106355
26. IDEAM. (2018). Atlas Climatológico de Colombia. Obtenido en: <http://atlas.ideam.gov.co/visorAtlasClimatologico.html>.
27. García, L. y Rubiano, L. (1984). Comunidades de líquenes como indicadores de niveles de calidad de aire en Colombia. *Cont. Amb. Volumen 8, Capítulo 13, Medellín-Colombia*.
28. Nimis, P. L., Ciccarelli, A., Lazzarin, G., Bargagli, R., Benedet, A., Castello, M., Gasparo, D., Lausi, D., Olivieri, S. y Tretiach, M. (1989). I licheni come bioindicatori di inquinamento atmosferico nell'area di schio. *Thiene: Breganze (VI). Boll. Mus. Civ. St. Nat. Verona* 16: 1-154.
29. Fernandez, A. B., Terrón, A. y Barreno, E. (2006). Bioindicadores de la calidad del aire en La Robla (León, noroeste de España) diez años después. *Lazaroa*, 27, 29-41.
30. Goward, T., Mccune, B., Meidinger, D. 1994. The lichens of British Columbia. British Columbia, Canada. Obtenido en <http://www.for.gov.bc.ca/hfd/pubs/docs/Srs/Srs08.htm>
31. Cornare (2017). Campaña de monitoreo de la calidad del aire, Contrato No. 340 – 2016. Consultado en: <http://www.cornare.gov.co/sistema-de-informacion-ambiental-regional/calidad-del-aire/>.
32. Cornare (2018). Informe final de calidad del aire. convenio interadministrativo número 320 de 2017. Consultado en: <http://www.cornare.gov.co/sistema-de-informacion-ambiental-regional/calidad-del-aire/>.
33. Cornare (2019) Informe final de calidad del aire de la campaña 2 de monitoreo del convenio interadministrativo Cornare-Universidad de Antioquia número 228- 2018. Consultado en: <http://www.cornare.gov.co/sistema-de-informacion-ambiental-regional/calidad-del-aire/>.
34. Ministerio de Ambiente, Ambiente y Desarrollo Territorial. Resolución 610 del 24 de marzo de 2010. Bogotá, 11p.
35. Richardson, D.H.S. 1988. Understanding the pollution sensitivity of lichens. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 96: 31-43.
36. Ederra, A. (1996). *Botánica ambiental aplicada*. 2ª edición. Pamplona: Ediciones EUNESA.

Received: 4 noviembre 2020

Accepted: 4 enero 2021



cedia

**CORPORACIÓN ECUATORIANA
PARA EL DESARROLLO DE LA
INVESTIGACIÓN Y LA ACADEMIA**



CEDIAec

www.cedia.edu.ec

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Optimization of the micropropagation of elite adult trees of *Sequoia sempervirens*: forest species of interest in the Basque Country, Spain

Alejandra Rojas Vargas^{1,2}, Castander-Olarieta A.², Moncaleán P.², Montalbán I.A.^{2*}DOI. [10.21931/RB/2021.06.01.11](https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.01.11)

Abstract: Forest trees are renewable sources of timber and other valuable non-timber products. Nowadays, the increase in population and demand for forestry products results in overexploitation of forestry. Therefore, there is an urgent need to produce elite plants with higher productivity under stress derived from climate change to have available to afforestation. For this reason, propagation methods should be improved to be more efficient in terms of quality and productivity. The main species planted in the Basque Country is *Pinus radiata*; during the last three years, *Pinus radiata* plantations have suffered a fungus attack affecting mainly needles until the tree's death. This crisis is caused by the combined action of two fungi of the genus *Dothistroma* and *Lecanosticta acicola*, whose expansion seems to have been enhanced by weather-related factors, such as humid and hot summers. Although we have evidence of this disease's presence in our mountains since 1942, the disease has had a speedy expansion with an aggressive effect for reasons that are not scientifically known today. For the above, Basque Country forestry sector is looking for alternative species to be used in its plantations. Part of the forestry sector considers that *Sequoia sempervirens* could be a good choice for plantations. Besides, its high-quality wood and its tolerance to the attack of several pathogens and other diseases derived from climate change are characteristics that could confer some advantage over other forest species. The main goal of this study was to optimize the micropropagation of adult elite trees of *Sequoia sempervirens*. The effect of 6-benzylaminopurine, meta-Topolin and Kinetin, and 4 types of explant in the multiplication stage were analyzed to carry out this objective. Furthermore, the effect of two types of auxins: 1-naphthalene acetic acid, indole-3-butyric acid, and a mixture of both, were evaluated on the induction of roots and their subsequent effect on the acclimatization process. The best multiplication index was obtained when 4.4 μ M 6-benzylaminopurine and apical explants longer than 1.5 cm of length were used. The root induction percentage was 75% in the most responsive genotype analyzed when 4.4 μ M 6-benzylaminopurine was used on the induction stage, and 50 μ M of 1-naphthalene acetic acid was used for rooting. Finally, after 3 months in the greenhouse, the explants cultured with Kinetin and rooted in a culture medium with indole-3-butyric acid showed the highest acclimatization success (94%).

1511

Key words: Acclimatization, auxins, cytokinins, multiplication index, organogenesis, rooting, shoot induction.

Introduction

The Coast redwood or California redwood *Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl. (Taxodiaceae) is a valuable forest species and occurs naturally in Western North America, especially in California^{1,2}. This species is the tallest tree on earth with a high volume of standing biomass, in some stands exceeding 3500 metric tons/hectare³.

This conifer has been introduced and domesticated in European countries such as Romania, Spain, France, Great Britain, Russia, and Turkey, and it can be used for reforestation due to the quality of its wood and for ornamental purposes. In Spain, this species has been used by foresters for its productivity, its tolerance to the attack of several pathogens and other diseases. Moreover, its reforestation is recommended on valley bottoms and foothills⁴.

Nowadays, redwood shows seed reproduction difficulties, displaying low germination and rooting rates, dormancy of the shoot, and low seedling viability^{5,6}. Therefore, biotechnological *in vitro* techniques of plant tissue culture as micropropagation, organogenesis, adventitious or axillary shoot/bud regeneration, shoot tip culture, micrografting, and somatic embryogenesis emerged as useful tools for the propagation and conservation of germoplasm^{7,8,9}.

There are few investigations on micropropagation in the specific case of *Sequoia sempervirens*, either through organogenesis or somatic embryogenesis. Arnaud *et al.*¹⁰ developed a protocol for micropropagation and rejuvenation of the species

using direct organogenesis and somatic embryogenesis. Years later, Mihaljević *et al.*¹ investigated the root formation in micropropagated shoots of *Sequoia sempervirens* using *Agrobacterium*. In the 21st century, Korban and Soul¹¹ developed a procedure for the micropropagation of juvenile and adult material, and Lui *et al.*¹² worked on the shoot regeneration and somatic embryogenesis from needles of redwood. The medium-term conservation of *Sequoia sempervirens* was investigated by Ozudogru *et al.*⁶, and Meneguzzi *et al.*² evaluated shoot multiplication of two *Sequoia sempervirens* genotypes with the addition of Kinetin.

Considering all the information mentioned above, our study's objective was to optimize the micropropagation process of elite selected adult trees of *Sequoia sempervirens*. We focused on improving 1) the multiplication phase using different types of explants and cytokinins, 2) the rooting using different auxins, and the subsequent acclimatization phase under *ex vitro* conditions.

Materials and methods

Plant material

Stem sections were collected from the basal parts of three different mother trees (7, 11 and 12) of *Sequoia sempervirens*

¹Instituto de Investigación y Servicios Forestales, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

²NEIKER-BRTA, Department of Forestry Sciences, Arkaute.01192, Spain.

located in Ataun, Gipuzkoa, Basque Country (Spain), at the geographic coordinates: 42° 58' 41" N and 2° 10' 53" O.

Shoot induction

In vitro micro shoots growing in half-strength ARN medium (Arnaud *et al.*¹⁰) were selected to carry out the experiments. Four types of explants were used: A) apical explants of 1.5 cm in length (AG), B) apical explants of 1.0 cm length (AP), C) basal explants of 1.5 cm length (BG), and D) basal explants of 1.0 cm in length (BP). Explants were cultured in glass jars (Merck) with 25 mL of ARN multiplication medium supplemented with 3% sucrose and 8 gL⁻¹ Difco Agar®. The effect of different cytokinins for the induction of shoots was evaluated: A) 6-benzylaminopurine (BAP), B) meta-Topolin (m-T), and D) kinetin (K) at a concentration of 4.4 µM. The pH of the medium was adjusted to 5.8 before autoclaving (121°C, 20 min). The explants were cultivated in the different induction media for four weeks in the growth chamber at a temperature of 21 ± 1°C, under 16-h photoperiod with 120 µmol m⁻² s⁻¹ of light intensity cool white fluorescent tubes (TLD 58 W/33; Philips, France).

Shoot elongation

The explants induced in the multiplication phase were cultivated for six weeks in shoot elongation medium. This medium was half strength ARN (Arnaud *et al.*¹⁰) supplemented with 2 gL⁻¹ activated charcoal and solidified with 9 gL⁻¹ Difco Agar®. The pH of the medium was adjusted to 5.8 before autoclaving (121°C, 20 min).

Root induction and acclimatization of plants

After the elongation phase, stems with at least 2.5 cm in length were used for root induction. Traceability of the explant was maintained according to its origin (genotype and cytokinin treatment used along the shoot induction stage). Subsequently, the stems were grown in root inducing medium (RIM), which consisted of 1/3 strength ARN basal medium supplemented with three different auxin treatments: A) 50 µM 1-naphthalene acetic acid (NAA), B) 50 µM indole-3-butyric acid (IBA), and C) a mixture of 40 µM NAA µM + 10 µM IBA. All the different media were solidified with 9 gL⁻¹ Difco Agar®. The culture medium's pH was adjusted to 5.8 before autoclaving (121°C, 20 min).

The stems were placed in the dark at 21 ± 1°C for 8 days. After this period, the stems were cultured in the root expression medium (REM), which consisted of 1/3 strength ARN basal medium (Arnaud *et al.*¹⁰) without plant growth regulators and solidified with 9 gL⁻¹ Difco agar®. The pH of the medium was adjusted to 5.8 before autoclaving (121°C, 20 min). The cultures were placed in the growth chamber at a temperature of 21 ± 1°C, under 16-h photoperiod at 120 µmol m⁻² s⁻¹. After six weeks of culture in REM medium, explants with visible roots were transferred to wet peat: vermiculite mixture (2:1, v/v) and acclimatized in the greenhouse under controlled conditions at 21 ± 1°C and decreasing humidity progressively along one month from 95 to 80%.

Data collection and statistical analysis

To assess the genotype's effect on each of the variables of this study, an analysis of variance was performed (ANOVA), followed by a Tukey's *post hoc* test ($\alpha=0.05$). The genotype had a significant effect on all variables studied. For this reason and to obtain robust conclusions, the genotype factor was introduced into all the models as a block variable to reduce variability and analyze the effect of the other variable factors (the type of explant, cytokinin treatment, and auxin treatment) more accurately.

The shoot induction and the number of shoots per explant were recorded after six weeks. The experiment used a completely randomized design with 25 explants per treatment. Logistic regression was performed to assess the effect of the type of explant and the cytokinin treatment on the shoot induction percentage, followed by a Tukey's *post hoc* test ($\alpha=0.05$) for multiple comparisons. The number of shoots per explant variable did not fulfill homoscedasticity and normality assumptions for ANOVA; then, a Kruskal-Wallis was performed.

The root induction percentage, the number of roots per explant, and the root length were recorded after six weeks in REM. A completely randomized design was carried out using ten stems per cytokinin treatment. As an exception, in genotype 7, four stems were employed when K was used in the induction stage.

A logistic regression model was used to analyze the auxin and cytokinin treatment's effect on the root induction percentage. Tukey's *post hoc* test ($\alpha=0.05$) was used for multiple comparisons. The number of roots per explant variable did not fulfill homoscedasticity and normality assumptions for ANOVA; then, a Kruskal-Wallis was performed.

Data on the length of the longest root were square-root transformed, and an ANOVA was performed; multiple comparisons were made using Tukey's *post hoc* test ($\alpha=0.05$).

After twelve weeks under *ex vitro* conditions, the survival percentage was calculated. The survival percentage variable did not fulfill homoscedasticity and normality assumptions for ANOVA; then a Kruskal-Wallis was performed.

Results

Shoot induction

When the genotype effect on the shoot induction percentage was evaluated, genotypes 12 and 11 showed significantly higher percentages (98.98%) than genotype 7 (79%, Table 1). As shown in Table 1, the number of shoots obtained in genotype 12 (5.04) was significantly higher than those obtained in genotypes 11 and 7 (3.21 and 3.28, respectively).

The deviance analysis of the factors studied showed a significant effect on both the shoot induction and the number of shoots per explant developed from each explant and cytokinin type.

There was a significant interaction between the explant type and the cytokinin type (Table 2).

Variable	Genotype		
	7	11	12
Shoot induction (%)	79.00±0.03 ^b	98.98±0.01 ^a	98.98±0.01 ^a
N° shoots /explant	3.28±0.12 ^b	3.21±0.07 ^b	5.04±0.16 ^a

Table 1. Shoot induction (%) and number shoots per explant from *Sequoia sempervirens* elite adult trees cultured in ARN medium (Arnaud *et al.*¹⁰).

Data are presented as mean values ± S.E. Different letters within a row indicate significant differences ($p<0.05$).

Source	df	Shoot induction		N° shoots /explant	
		X ² Test	p-Value	X ² Test	p-Value
Explant type (E)	3	382.39	0.00011*	23.63084	2.98290 ^{-5*}
Cytokinin type (C)	2	403.24	0.01861*	142.0222	<2.0 ^{-16*}
E x C	6	374.86	n.s	188.8565	<2.0 ^{-16*}

Table 2. Analysis of deviance for shoot induction (%) and number shoots per explant from *Sequoia sempervirens* elite adult trees cultured in ARN medium (Arnaud *et al.*¹⁰).

*Significant differences at $p < 0.05$, ^{n.s} Non-significant at $p < 0.05$, df Degrees of freedom.

Significantly higher shoot induction percentages were obtained in AP, BG and BP explants (between 91% and 94%) than in AG explants (84%) (Table 3).

Explant type	Shoot induction (%)
AG	84.00 ± 0.02 ^b
AP	94.00 ± 0.02 ^a
BG	91.00 ± 0.02 ^a
BP	94.00 ± 0.02 ^a

Table 3. Shoot induction (%) in different explant types from *Sequoia sempervirens* elite adult trees cultured in ARN medium (Arnaud *et al.*¹⁰) (apical explants of 1.5 cm in height (AG), apical explants of 1.0 cm height, C) basal explants of 1.5 cm height (BG) and basal explants of 1.0 cm in height (BP).

Data are presented as mean values ± S.E. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

When considering the effect of the cytokinin type on shoot induction percentages, shoots induced with m-T showed significantly higher induction percentages than shoots induced with K. Shoots induced in the presence of BAP displayed intermediate values (92%) (Table 4).

Cytokinin type	Shoot induction (%)
BAP	92.00 ± 0.02 ^{ab}
K	87.00 ± 0.02 ^b
m-T	93.00 ± 0.01 ^a

Table 4. Shoot induction (%) in different cytokinin type from *Sequoia sempervirens* elite adult trees cultured in ARN medium (Arnaud *et al.*¹⁰).

Data are presented as mean values ± S.E. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

When evaluating the number of shoots per explant, a significant interaction between explant type and cytokinin was observed. The best results were obtained in AG, AP and BG explants induced with m-T and in AG explants induced with BAP (Figure 1). When BAP or m-T were used for induction, the worst results were obtained in BP explants. The lowest response was observed in treatment K, independently of the explant type.

Despite there were no statistically significant differences between BG/m-T, AP/m-T, and AG/BAP, it is essential to mention that the appearance of induced shoots was different [Figure 2 (A-C)]. The shoots induced in BAP and K were greener and more vigorous (Figure 2 A) than the explants cultured in m-T (2 B, C). These explants from m-T treatments were more yellowish and less vigorous (Figure 2 B and C). Therefore, AG explants cultured in the presence of BAP showed the best re-

sults for shoot induction.

Since AG explants showed the best appearance, a comparative figure was done to describe the aspect of regenerated shoots in cytokinins' presence (Figure 3). The most vigorous shoots were observed in the presence of BAP and K (Figure 3 (A-C, G-H)).

Root induction

A significantly higher root induction percentage was obtained in genotype 12 (93%) (Table 5). The lowest response was genotype 7 (31%), and intermediate values were recorded for genotype 11 (55%). Also, a significantly higher number of roots per explant was observed in genotype 12 (4.73) than genotype 7 and 11 (Table 5).

On the contrary, significantly longer primary roots were recorded for genotype 11 (3.73 cm, Figure 4A) and genotype 7 (2.95 cm, Figure 4B) than for genotype 12 (2.18 cm, Figure 4C).

The auxin type and cytokinin type used in the multiplication stage showed a significant effect on the root induction percentage. Further, the cytokinin type showed a significant effect on the longest root's length (Table 6). Regarding the number of roots per explant, no significant differences were found for the variables tested.

As shown in Table 7, a significantly higher root induction percentage was obtained in the treatment with NAA (70%) than in treatments with IBA or IBA/NAA mixture. As mentioned before, there was no effect of the auxin treatment on the number of roots per explant (ranging from 2.98 to 3.94) or on the length of the primary root (ranging from 2.23 to 3.09 cm) (Table 7).

When evaluating the effect of the cytokinin type over root induction percentage, significantly higher values were obtained from shoots induced in BAP treatment when compared with those induced in m-T and K treatment (Table 8).

As aforementioned, no significant differences were found for the number of roots per explant, independently of the shoot induction treatment applied (ranging from 3.11 to 3.89) (Table 8).

The longest primary roots (3.32 cm) showed significantly higher values when shoots were induced in BAP treatment (Table 8).

Acclimatization of rooted microplants

The analysis of deviance for survival (%) of rooted shoots propagated *in vitro* showed a significant effect of the auxin type applied in the root induction stage and of the cytokinin type applied in the shoot induction phase (Table 9).

When the effect of auxin type on the survival percentage of rooted shoots was analyzed, the presence of IBA in the rooting medium provoked a significantly higher survival percentage (94%) than the mixture IBA/NAA and NAA treatments (Table 10).

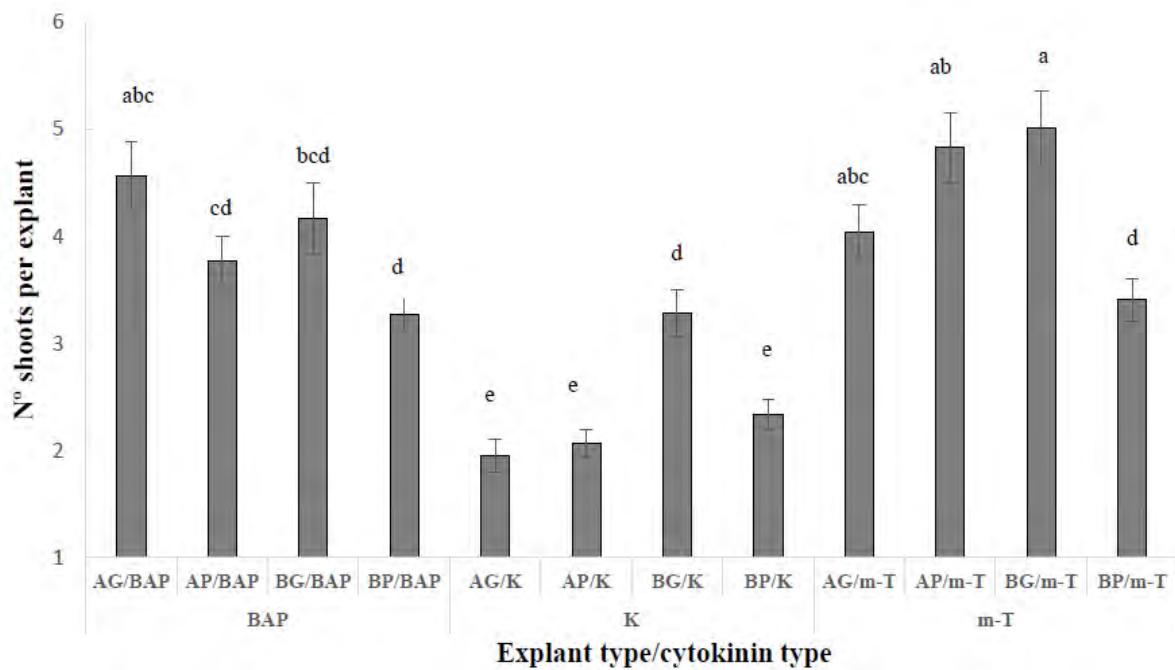


Figure 1. Number of shoots per explant in different explant types from *Sequoia sempervirens* elite adult trees cultured in ARN medium (Arnaud *et al.*¹⁰) supplemented with different cytokinins (BAP, m-T, K), (apical explants of 1.5 cm in length (AG), apical explants of 1.0 cm length (AP), basal explants of 1.5 cm length (BG) and basal explants of 1.0 cm in length (BP)). Data are presented as mean values \pm S.E. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

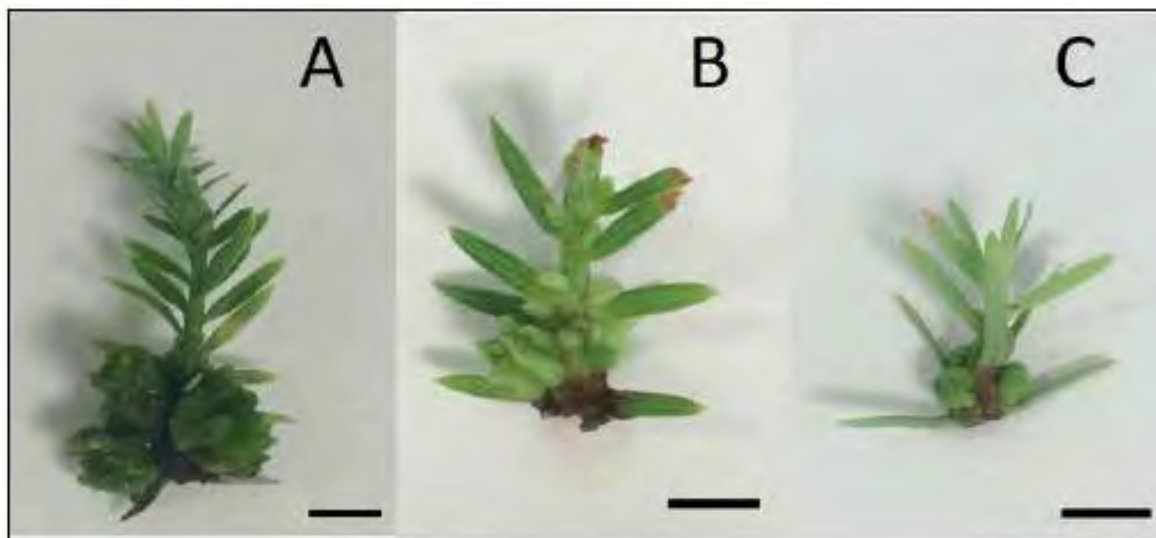


Figure 2. Shoot induction from *Sequoia sempervirens* elite adult trees cultured in ARN multiplication medium (Arnaud *et al.*¹⁰) cultured for 6 weeks: (A) apical explant > 1.5 cm of length (AG) of genotype 7 on ARN medium + 4.4 μ M BAP, bar = 3 mm; (B) basal explant > 1.5 cm of length (BG) of genotype 7 on ARN medium + 4.4 μ M m-T, bar = 5 mm; (C) apical explant < 1.5 cm of length (AP) explant of genotype 7 on ARN medium + 4.4 μ M m-T, bar = 3 mm.

Variable	Genotype		
	7	11	12
Root induction (%)	31.25 \pm 0.04 ^c	55.42 \pm 0.04 ^b	93.47 \pm 0.02 ^a
N° roots /explant	2.14 \pm 0.27 ^b	1.69 \pm 0.11 ^b	4.73 \pm 0.25 ^a
Length of longest root (cm)	2.95 \pm 0.21 ^a	3.73 \pm 0.33 ^a	2.18 \pm 0.12 ^b

Table 5. Root induction (%), number roots per explant, and the longest root from *Sequoia sempervirens* elite adult trees cultured in ARN medium (Arnaud *et al.*¹⁰). Data are presented as mean values \pm S.E. Different letters within a row indicate significant differences ($p < 0.05$).

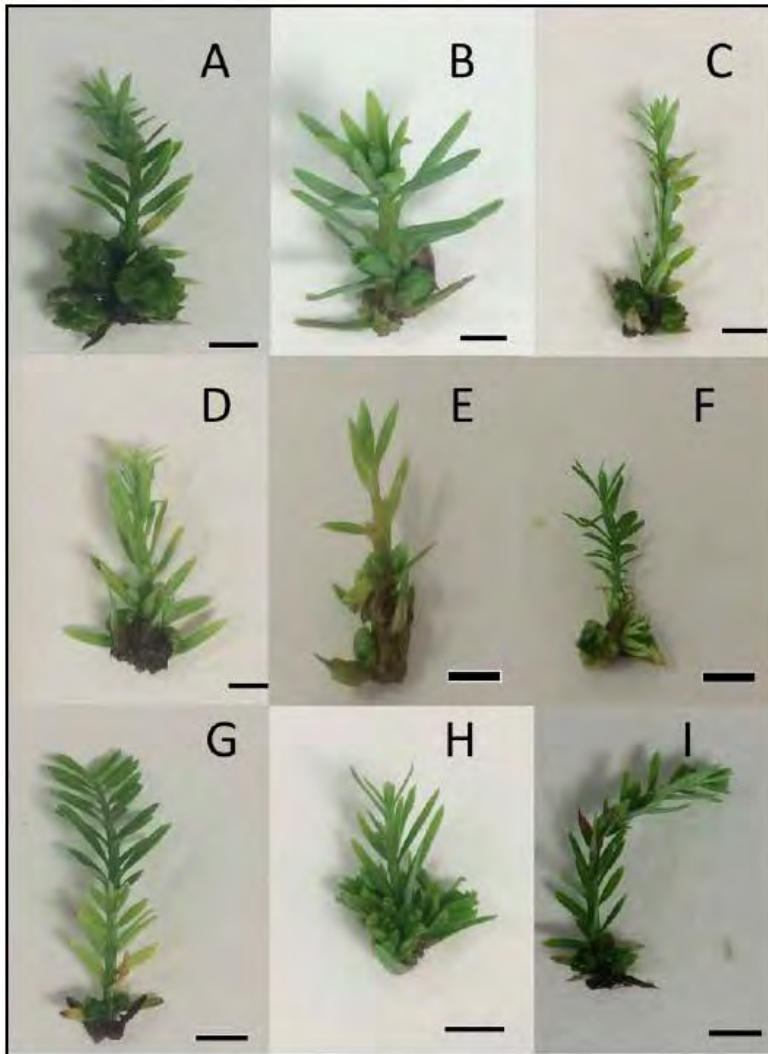


Figure 3. Shoot induction from *Sequoia sempervirens* elite adult trees cultured in ARN multiplication medium (Arnaud *et al.*¹⁰) cultured for 6 weeks: (A) apical explant > 1.5 cm of length (AG) of genotype 7 on ARN medium + 4.4 μM BAP, bar = 3 mm; (B) AG of genotype 11 on ARN medium + 4.4 μM BAP, bar = 3 mm; (C) AG explant of genotype 12 on ARN medium + 4.4 μM BAP, bar = 3 mm; (D) AG explant of genotype 7 on ARN medium + 4.4 μM m-T, bar = 3 mm; (E) AG explant > 1.5 of genotype 11 on ARN + 4.4 μM m-T, bar = 5 mm; (F) AG explant of genotype 12 on ARN medium + 4.4 μM m-T, bar = 5 mm; (G) AG of genotype 7 on ARN medium + 4.4 μM K, bar = 3 mm; (H) AG explant of genotype 11 on ARN medium + 4.4 μM K, bar = 5 mm; (I) AG of genotype 12 on ARN medium + 4.4 μM KIN, bar = 3 mm.

Source	df	Root induction		N° roots /explant		Length of the longest root	
		X ² Test	p-Value	X ² Test	p-Value	F Test	p-Value
Auxin type (A)	2	510.96	0.01099*	3.42422	n.s	2.703	0.06913
Cytokinin type (C)	2	503.59	0.02503*	1.15589	n.s	5.469	0.00479*
A x C	4	496.71	n.s	11.81255	n.s	1.042	n.s

Table 6. Analysis of deviance for root induction (%), number roots per explant, and length of longest root from *Sequoia sempervirens* elite adult trees cultured in ARN medium (Arnaud *et al.*¹⁰).

*Significant differences at $p < 0.05$, n.s Non-significant at $p < 0.05$, df Degrees of freedom.

Variable	Auxin types		
	IBA	IBA/NAA	NAA
Root induction per-cent	60.00±0.04 ^b	57.00±0.04 ^b	70.00±0.04 ^a
N° roots /explant	2.98±0.25 ^{n.s}	3.94±0.35 ^{n.s}	3.30±0.26 ^{n.s}
Length of longest root (cm)	2.77±0.21 ^{n.s}	2.23±0.17 ^{n.s}	3.09±0.25 ^{n.s}

Table 7. Root induction (%), number of roots per explant and length of the longest root in *Sequoia sempervirens* elite adult trees cultured in ARN medium (Arnaud *et al.*¹⁰) supplemented with different auxin types (IBA, IBA/NAA or NAA).

Data are presented as mean values ± S.E. Different letters within a row indicate significant differences ($p < 0.05$).^{n.s} Non-significant.

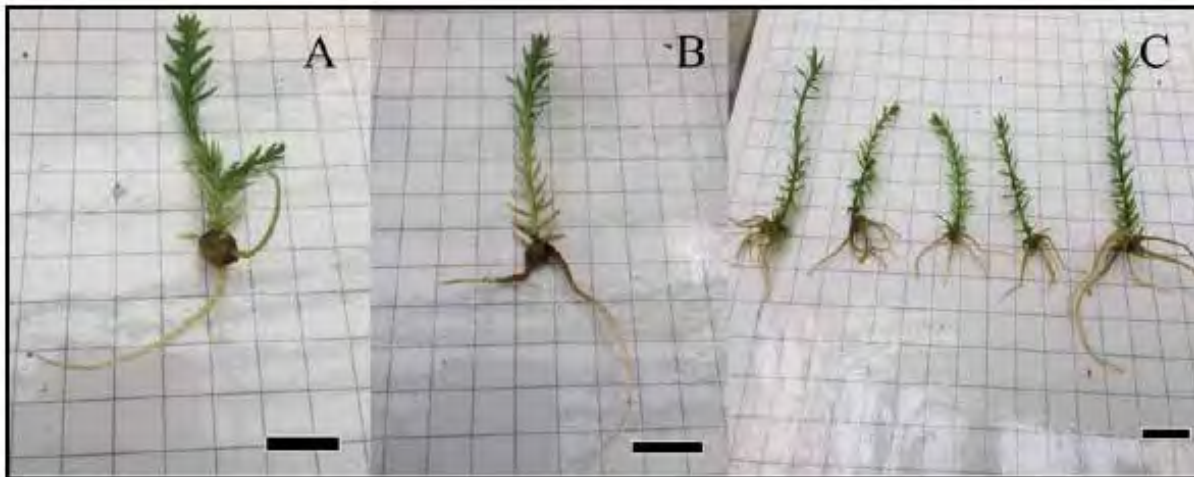


Figure 4. Root induction from *Sequoia sempervirens* elite adult trees micro shoots cultivated *in vitro* for 6 weeks on root expression medium (REM) (Arnaud *et al.*¹⁰): (A) explant of genotype 7 induced in root inducing medium (RIM) (Arnaud *et al.*¹⁰) + 50 μ M NAA (BAP applied in shoot induction stage), bar = 2 cm (B) explant of genotype 11 induced in RIM medium + 50 μ M NAA (BAP applied in shoot induction stage), bar = 2 cm; (C) explant of genotype 12 induced in RIM medium + 50 μ M NAA (BAP applied in shoot induction stage), bar = 2 cm.

Cytokinin type applied in the root induction stage			
Variable	BAP	m-T	K
Root induction (%)	66.00 \pm 0.04 ^a	58.00 \pm 0.04 ^b	62.00 \pm 0.04 ^b
N ^o roots /explant	3.11 \pm 0.24 ^{n.s}	3.89 \pm 0.33 ^{n.s}	3.16 \pm 0.29 ^{n.s}
Length of longest root (cm)	3.32 \pm 0.22 ^a	2.39 \pm 0.21 ^b	2.48 \pm 0.24 ^b

Table 8. Root induction (%), number roots per explant, and length of longest root in different cytokinin types from *Sequoia sempervirens* elite adult trees cultured in ARN medium (Arnaud *et al.*¹⁰). Data are presented as mean values \pm S.E. Different letters within a row indicate significant differences ($p < 0.05$), n.s Non-significant.

Source	df	Survival (%)	
		X ² Test	p-Value
Auxin type (A)	2	244.40	5.679 ^{-5*}
Cytokinin type (C)	2	223.62	3.075 ^{-5*}
A x C	4	216.66	n.s

Table 9. Analysis of deviance for survival (%) of rooted shoots propagated *in vitro* coming from *Sequoia sempervirens* elite adult trees, after twelve weeks under *ex vitro* conditions.

*Significant differences at $p < 0.05$, n.s Non-significant at $p < 0.05$, df Degrees of freedom.

	Auxin type		
	IBA	IBA/NAA	NAA
Survival %	94.00 \pm 0.03 ^a	79.00 \pm 0.06 ^b	68.00 \pm 0.05 ^b

Table 10. *Ex Vitro* survival (%) of *in vitro* rooted shoots from *Sequoia sempervirens* elite adult trees, shoots were rooted in ARN medium (Arnaud *et al.*¹⁰) supplemented with different auxins (IBA, IBA/NAA, or NAA).

Data are presented as mean values \pm S.E. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Regarding the effect of the cytokinin applied in the shoot induction stage as shown in Table 11, the shoots induced in K treatment showed a significantly higher *ex vitro* survival percentage than those induced in BAP or m-T treatments.

At the end of the experiment, the micro propagated plants from the three elite adult trees evaluated showed normal development, profitable growth, and uniformity after 5 months under *ex vitro* conditions in the greenhouse (Figure 5).

Discussion

The genotype is an endogenous factor that has a significant role in regenerative potential in the overall repeatability and reliability of tissue culture protocol¹³. In this study, the shoot induction, the number of shoots per explant, the root induction, and the number of roots per explant were affected by the explant's genotype. Our results are in concordance with the results reported by Meneguzzi *et al.*², who observed different genotypes' responses in shoot multiplication of *S. sempervirens*. Similarly, Sul and Korban¹⁴ found differences in shoot proliferation and shoot elongation of *S. sempervirens*.

The organogenesis processes are influenced by endogenous and exogenous factors^{14,15,16}. There are different exogenous factors as the components in the tissue culture medium or the culture's environmental conditions. In this work, we ob-

served that the type of explant and chemical conditions in the culture medium (cytokinin and auxin type) significantly affected shoot induction and rooting response.

During the evaluation of the shoot induction rate, the explants with the most extended length (AG, AP and BG) showed the best induction rate, and the highest number of shoots per explant were obtained. Similar results were found by Clapa *et al.*¹⁷ and Meneguzzi¹⁸, who developed an *in vitro* protocol for *S. sempervirens* using shoot explants bigger than 1.5 cm in length. George¹⁶ reported that larger explants coming from more extensive parts of shoot apex or stem segments bearing one or more lateral buds could show advantages over smaller size explants.

Several studies about tissue culture protocols have reported positive effects on shoot proliferation, shoot multiplication rate, alleviating physiological disorders, better rooting, and acclimatization when using topolins for shoot induction^{15,19}. In our study, the explants induced in the presence of m-T exhibited the best results. In this sense, De Diego *et al.*²⁰, obtained a high rate of organogenic response in adult buds of *Pinus sylvestris* using m-T and suggested that it could be used as an alternative cytokinin BAP in micropropagation. Likewise, Bairu *et al.*²¹ obtained outstanding multiplication rates in *Aloe polyphylla* when used the same cytokinin. However, in the present study, these explants from m-T treatments were more

	Cytokinin type		
	BAP	m-T	K
Survival (%)	80.00±0.05 ^b	65.00±0.05 ^b	94.00±0.03 ^a

Table 11. *Ex vitro* survival (%) of *in vitro* rooted shoots from *Sequoia sempervirens* elite adult trees; shoots were propagated in ARN medium (Arnaud *et al.*¹⁰) supplemented with different cytokinins (BAP, m-T or K). Data are presented as mean values ± S.E. Different letters indicate significant differences by Tukey's post hoc test ($p < 0.05$).



Figure 5. Plants of *Sequoia sempervirens* cultured *in vitro* after 5 months growing in *ex vitro* conditions in the greenhouse, bar = 4 cm.

yellowish and less vigorous. In contrast, in *Prunus rootstocks*, *Pterocarpus marsupium*, and *Corylus colurna* a positive effect of m-T on the growth and quality of micro propagated shoots was found^{22,23,24}.

According to Sul and Korban¹⁴, Meneguzzi *et al.*¹⁸, Valverde *et al.*²⁵ and Montalbán *et al.*²⁶ in forestry species, BAP stimulated the axillary bud breakage and shoot elongation. In our study, a similar result was obtained in the BAP treatment. It is essential to mention that in the treatment with BAP the quality of the shoots formed (robustness and color) was superior to those shoots generated in the presence of m-T. In conclusion, in our study, BAP was the best cytokinin in shoot induction and the number of shoots per explant. This is in accordance with the results reported by Moncaleán *et al.*²⁷, Reanu *et al.*¹⁶, Aremu *et al.*¹⁵, and Bairu *et al.*²¹, confirming that BAP is the most used cytokinin in micropropagation due to its effectiveness and affordability. Regarding K treatment, in this work, we obtained the worst results in agreement with those found in *Barleria greenii* and *Eucalyptus globulus*^{28,29}.

In this research, the NAA treatment showed the best result in root induction response. This agrees with the results reported in *Sequoia sempervirens*, *Pinus radiata*, *Pinus pinaster*, and other coniferous species^{30,31,32,33,34}. It is essential to mention that the rooting percentages obtained in the present studies were higher than those recorded by Huang *et al.*³⁵, who obtained about a 30% of rooting competence using adult stem sections of *Sequoia sempervirens* in the presence of IAA/K. The number of roots per explant obtained in the IBA/NAA treatment presented the highest values. In species such as *Eucalyptus sideroxylon*, *Rosa hybrida* and *Citrus aurantifolia* the best root induction was obtained when using a mixture of IBA/NAA. Nonetheless, this treatment did not lead to the highest values in the number of roots per explant^{36,37,38}. The highest value in the longest root length was also obtained in NAA treatment, being under the results obtained in *Citrus aurantifolia*³⁸.

In our research, the induction stage's cytokinin type had a significant effect on root induction. Bairu *et al.*²¹, Werbrouck *et al.*³⁹, and Aremu *et al.*¹⁵ found that m-T stimulated *in vitro* rooting activity, but the m-T treatment presented the worst in our work results. In this sense, Bairu *et al.*⁴⁰ and Escalona *et al.*⁴¹ obtained negative carryover effects on rooting at too high m-T levels, so the m-T concentration applied in our cultures might have had a detrimental effect in the subsequent stages of development.

Regarding the acclimatization stage, the highest survival percentage was observed in plantlets rooted in IBA and developed in the presence of K. This result is in agreement with those found in *Eucalyptus globulus*, where the low concentration of IBA showed the best survival rates. In *Arachis paraguariensis* cultured in polyethylene terephthalate glycol vessel where IBA treatment was the best in survival^{42,43}.

Aremu *et al.*¹⁵ explained that cytokinins generally have inhibitory effects on rooting, resulting in low acclimatization rates afterward. In this sense, the plants from m-T treatment showed the lowest survival. In contrast, several studies have shown that plantlets coming from m-T induction treatments have been successfully acclimatized^{21,44}.

In conclusion, the role of auxins and cytokinins in the micropropagation of different types of explants and their relationship with the survival and acclimatization of seedlings in *ex vitro* conditions was analyzed. Our study results demonstrated that the apical explant³ 1.5 cm length, and BAP showed the best results in the shoot induction stage. Moreover, *in vitro* shoots rooted with IBA, led to a higher *ex vitro* survival. Finally, the results shown allow the development of forthcoming stu-

dies for large-scale propagation of this species in semi-solid systems and bioreactors.

Bibliographic references

1. Mihaljević, S., Katavić, V. & Jelaska, S. Root formation in micropropagated shoots of *Sequoia sempervirens* using *Agrobacterium*. *Plant Sci.* 141, 73–80 (1999). <https://doi.org/10.1073/pnas.85.15.5536>
2. Meneguzzi, A. et al. Shoot multiplication of two *Sequoia sempervirens* genotypes with addition of small concentrations of Kinetin. *Pesqui. Florest. Bras.* 39, 1–8 (2019). <http://dx.doi.org/10.4336/2019.pfb.39e201701550>
3. Taha, L. S., Taie, H. A. A., Metwally, S. A. & Fathy, H. M. Effect of laser radiation treatments on *in vitro* growth behavior, antioxidant activity and chemical constituents of *Sequoia sempervirens*. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 5, 1024–1034 (2014).
4. Fernando Otazua. *Especies forestales 02.SECOYA, SEQUOIA, SEQUOIA ROJA. SEQUOIA DE CALIFORNIA (Sequoia sempervirens ENDL.)*. *Rev. la Asoc. For. Navarra* 39, 06–09 (2016). <https://www.foresna.org/wp-content/uploads/navarra-forestal39.pdf>
5. Burns, Russell M., and Barbara H. Honkala, tech. coords. *Silvics of North America: 1. Conifers; 2. Hardwoods. Agriculture Handbook 654*. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washington, DC, vol.2, 877 p. (1990). http://na.fs.fed.us/spfo/pubs/silvics_manual/Volume_1/vol11_Table_of_contents.html
6. Ozudogru, E. A. et al. Medium-term conservation of redwood (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.) *in vitro* shoot cultures and encapsulated buds. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 127, 431–435 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.10.013>
7. Vengadesan, G., Ganapathi, A., Amutha, S. & Selvaraj, N. *In vitro* propagation of *Acacia* species - A review. *Plant Sci.* 163, 663–671 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00144-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00144-9)
8. De Souza, R. A., Padilha Dantas, P. V., Cavalcante, P. D. F., Tenório, R. R. & Houllou, L. M. Basic procedure for the *in vitro* propagation of Brazilian trees for reforestation purposes. *J. Environ. Anal. Prog.* 2, 107–114 (2017). <http://dx.doi.org/10.24221/jeap.2.2.2017.1139.107-114>
9. Bonga, J. M. Conifer clonal propagation in tree improvement programs. In: *Vegetative Propagation of Forest Trees*. Yill-Sung Park, Jan M Bonga, Heung-Kyu Moon (eds). National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul, Korea. pp 3–31. (2016). https://www.researchgate.net/publication/299263644_Conifer_clonal_propagation_in_tree_improvement_programs
10. Arnaud, Y., Francllet, A., Tranvan, H. & Jacques, M. Micropropagation and rejuvenation of *Sequoia sempervirens* (Lamb) Endl: a review. *Ann. des Sci. For.* 50, 273–295 (1993). <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00882846>
11. Sul, I. W. & Korban, S. S. Effect of different cytokinins on axillary shoot proliferation and elongation of several genotypes of *Sequoia sempervirens*. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 30, 131–135 (1994). <https://doi.org/10.1007/BF02632201>
12. Liu, C., Xia, X., Yin, W., Huang, L. & Zhou, J. Shoot regeneration and somatic embryogenesis from needles of redwood (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.). *Plant Cell Rep.* 25, 621–628 (2006). <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0120-y>
13. Coleman, G and Ernst, S. *In vitro* shoot regeneration of *Populus deltoides*: effect of cytokinin and genotype. *Plant Cell Rep.* 8, 459–462. <https://doi.org/10.1007/BF00269048>
14. Sul, I. W. & Korban, S. S. Direct shoot organogenesis from needles of three genotypes of *Sequoia sempervirens*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 80, 353–358 (2005). <https://doi.org/10.1007/s11240-004-1365-1>
15. Aremu, A. O., Bairu, M. W., Doležal, K., Finnie, J. F. & Van Staden, J. Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 108, 1–16 (2012). <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0007-7>
16. George, E. F., Hall, M. a., & Klerk, G.-J. De. *Micropropagation: Uses and Methods. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Vol 1. The Background*. Book. Springer Berlin Heidelberg (2008). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_1

17. Clapa, D. et al. *Sequoia sempervirens* in Transylvania. *Acta Hortic.* 885, 85–90 (2010). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.885.11>
18. Meneguzzi, A. et al. Agar and activated charcoal influence the in vitro development of shoot and root *Sequoia*. *Rev. Ciencias Agroveterinarias* 18, 20–24 (2020). <https://doi.org/10.5965/2238117118e2019020>
19. Moyo, M. et al. Deciphering the growth pattern and phytohormonal content in Saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia*) in response to in vitro cytokinin application. *N. Biotechnol.* 42, 85–94 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.02.001>
20. De Diego, N., Montalbán, I. A. & Moncaleán, P. In vitro regeneration of adult *Pinus sylvestris* L. trees. *South African J. Bot.* 76, 158–162 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.09.007>
21. Bairu, M. W., Stirk, W. A., Dolezal, K. & Van Staden, J. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: Can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 90, 15–23 (2007). <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9233-4>
22. Gentile, A. et al. Effect of meta-Topolin on micropropagation and adventitious shoot regeneration in *Prunus* rootstocks. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 118, 373–381 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0489-1>
23. Ahmad, A. & Anis, M. Meta-topolin improves in vitro morphogenesis, rhizogenesis and biochemical analysis in *Pterocarpus marsupium* Roxb.: a potential drug-yielding tree. *J. Plant Growth Regul.* 38, 1007–1016 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00344-018-09910-9>
24. Gentile, A., Frattarelli, A., Nota, P., Condello, E. & Caboni, E. The aromatic cytokinin meta-topolin promotes in vitro propagation, shoot quality and micrografting in *Corylus colurna* L. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 128, 693–703 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1150-y>
25. Valverde-Cerdas, L., Alvarado, L. & Hine, A. Micropropagation of clones from controlled crosses of *Gmelina arborea* in Costa Rica. *New For.* 28, 187–194 (2004). <https://doi.org/10.1023/B:NEFO.0000040945.75019.38>
26. Montalbán, I. A., De Diego, N. & Moncaleán, P. Testing novel cytokinins for improved in vitro adventitious shoots formation and subsequent ex vitro performance in *Pinus radiata*. *Forestry* 84, 363–373 (2011). <https://doi.org/10.1093/forestry/cpr022>
27. Moncaleán, P. et al. Organogenic responses of *Pinus pinea* cotyledons to hormonal treatments: BA metabolism and cytokinin content. *Tree Physiol.* 25, 1–9 (2005). <https://doi.org/10.1093/treephys/25.1.1>
28. Amoo, S. O., Finnie, J. F. & van Staden, J. The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems. *Plant Growth Regul.* 63, 197–206 (2011). <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9504-7>
29. Bennett, I.J., McComb, J.A., Tonkin, C.M., McDavid, D.A.J. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates in vitro shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. *Annals of Botany*, 74, 53–58 (1994). <https://doi.org/10.1006/anbo.1994.1093>
30. Halmagyi, A. et al. Effects of naphthenic acids on rooting of in vitro grown *Sequoia sempervirens*. *Acta Hortic.* 885, 139–144 (2010). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.885.18>
31. Montalbán, I. A. & Moncaleán, P. Rooting of *Pinus radiata* somatic embryos: factors involved in the success of the process. *J. For. Res.* 30, 65–71 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0618-5>
32. De Diego, N., Montalbán, I. A., Fernandez De Larrinoa, E. & Moncaleán, P. In vitro regeneration of *Pinus pinaster* adult trees. *Can. J. For. Res.* 38, 2607–2615 (2008). <https://doi.org/10.1139/X08-102>
33. De Diego, N., Montalbán, I. A. & Paloma, M. Improved micropropagation protocol for maritime pine using zygotic embryos. *Scand. J. For. Res.* 26, 202–211 (2011). <https://doi.org/10.1080/0282758.1.2011.559174>
34. Ragonezi, C. et al. Adventitious rooting of conifers: Influence of physical and chemical factors. *Trees - Struct. Funct.* 24, 975–992 (2010). <https://doi.org/10.1007/s00468-010-0488-8>
35. Huang, L. C. et al. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks in vitro: Model for phase reversal of trees. *Plant Physiol.* 98, 166–173 (1992). <https://doi.org/10.1104/pp.98.1.166>
36. Cheng, B., Peterson, C. M. & Mitchell, R. J. The role of sucrose, auxin and explant source on in vitro rooting of seedling explants of *Eucalyptus sideroxylon*. *Plant Sci.* 87, 207–214 (1992). [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(92\)90152-C](https://doi.org/10.1016/0168-9452(92)90152-C)
37. Khosh- Khui and Sink Scientific. Rooting enhancement of *Rosa hybrida* for tissue culture propagation. *Sci. Hortic.* 17, 371–376 (1982). [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(82\)90118-2](https://doi.org/10.1016/0304-4238(82)90118-2)
38. Al-Bahrany, A. M. Effect of phytohormones on in vitro shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 95, 285–295 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00349-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00349-1)
39. Werbrouck, S., Strnad, M., Van Onckelen, H. Meta topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiologia Plantarum*. 98, 291–297 (1996). <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1996.980210.x>
40. Bairu, M. W., Stirk, W. A., Dolezal, K. & Van Staden, J. The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars 'Williams' and 'Grand Naine' (*Musa* spp. AAA). *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 95, 373–379 (2008). <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9451-4>
41. Escalona, M.; Cejas, I.; Gonzáles-Olmedo, J.; Capote, I.; Roels, S.; Cañal, M.J.; Rodríguez, R.; Sandoval Fernandez, J.A.; Debergh, P. The effect of meta-topolin on plantain propagation using a temporary immersion bioreactor. *Infomusa* 12, 28–30 (2003). <https://www.musalit.org/seeMore.php?id=8153>
42. Bennett, I.J.; McDavid, D.A.J.; McComb, J. The influence of ammonium nitrate, pH and indole butyric acid on root induction and survival in soil of micropropagated *Eucalyptus globulus*. *Biol. Plant.* 47, 355–360 (2003). <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000023877.21262.a5>
43. Aina, O. O., Quesenberry, K. H. & Gallo, M. Culture vessel and auxin treatments affect in vitro rooting and ex vitro survival of six *Arachis paraguariensis* genotypes. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 183, 167–171 (2015). <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.12.006>
44. Naaz, A., Hussain, S. A., Anis, M. & Alatar, A. A. Meta-topolin improved micropropagation in *Syzygium cumini* and acclimatization to ex vitro conditions. *Biol. Plant.* 63, 174–182 (2019). <https://doi.org/10.32615/bp.2019.020>

Received: 18 December 2020

Accepted: 10 January 2021

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Solanum betaceum in vitro seed germination and seedling development in response to pregerminative treatments

K. S. Salazar-Vega¹, I. Vaca¹

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.12

Abstract: Germination and seedling development are critical stages in the life cycle of plants. Insufficient seedling emergence and inadequate establishment of woody plants are significant constraints in producing crops such as tamarillo. The application of pregerminative protocols improves the germination percentage, reduces the seedling emergence time, and improves several species *in vitro*. The present study was conducted to contrast three pregerminative treatments on *Solanum betaceum* seeds. When evaluating the pregerminative treatments, treatment T3 (imbibition for 24 hours) obtained the best results, showing an average of 21.62 days to germination, 73% germinated seeds and 2.31 leaves per explant.

Key words: Tamarillo, imbibition, agriculture, biotechnology, plant tissue culture.

Introduction

Solanum betaceum or tamarillo is a plant species from the Andean territory. This species is mainly grown due to its high nutritional value of edible fruits. Commercial production of plants using micropropagation techniques has several advantages over traditional propagation methods; in addition to being a rapid propagation process, it can lead to pathogen-free plants' production.

Pregerminative treatments can be applied to seed explants before or after a disinfection protocol has been developed. The objective of pregerminative treatments is to improve the germination rate while ensuring the successful development of the seedlings, playing an essential role as the first step in crop cultivation. The rigid structure of seed coats may be the reason for seed dormancy depending on the species, making it difficult to absorb water during germination; physical, mechanical, or chemical scarification treatments help resolve dormancy conditions in the seeds. The use of procedures to end the tegument's dormancy causes a better response in the time, and a higher percentage of germination, one of the common strategies is to hydrate the seeds for 24 h at room temperature.

The scarification procedure's efficiency depends on the technician's skill and practice; if the scarification is too deep, it may damage the embryonic axis, and if it is too shallow, it may not be enough to overcome the mechanical barriers that block seed germination.

Pregerminative treatments induced a particular physiological state in the seeds and had become a promising strategy to improve a plant's behavior in the field; there is great interest for farmers and seed companies to find suitable affordable pregerminative treatments, but also to precisely identify the

improved agronomic properties as a result of their application in crops.

Methods

First, the seeds were soaked in 1.33% v/v iodine for 15 minutes, followed by 3 washes with sterile distilled water. Then they were immersed in sodium hypochlorite at 1.5% v/v for 10 minutes, 5 washes were carried out with sterile distilled water. The disinfection protocol was then performed in a laminar flow cabinet, disinfected in advance with 70% alcohol, and exposed to ultraviolet light for 15 min, adjacent to the instruments to be handled. Basal medium MS (MS519) was prepared with a 50% salt concentration, enriched with 20 g/L of sucrose, 6 g/L of Phyto Agar, and 50 ppm of citric acid. The medium's pH was adjusted to 5.8, and it was sterilized by autoclaving at 121 ° C for 15 minutes. The experimental unit was set as 2 x 15 cm borosilicate glass screw cap culture tubes containing 15 mL of culture medium; 2 seeds were placed per tube. The treatments are described in table 1[NSV4].

Results and Discussion

Germination

Treatment T3 showed the lowest number of days to germination with an average of 21.62 days, besides it reached an average of 73% germination, this response is attributed to the hydration time for 24 hours (Figure 1); it is consistent with several authors who report an increase in germination tanks

TREATMENT	DESCRIPTION
T1	10 vol. Hydrogen peroxide, during 5 min; 48 h hydropriming and changing of water at 24 h
T2	Scarification and hydro priming during 24 h
T3	Hydropriming during 24 h
T0	Control treatment

Table 1. Pregerminative treatments applied to *Solanum betaceum* seeds.

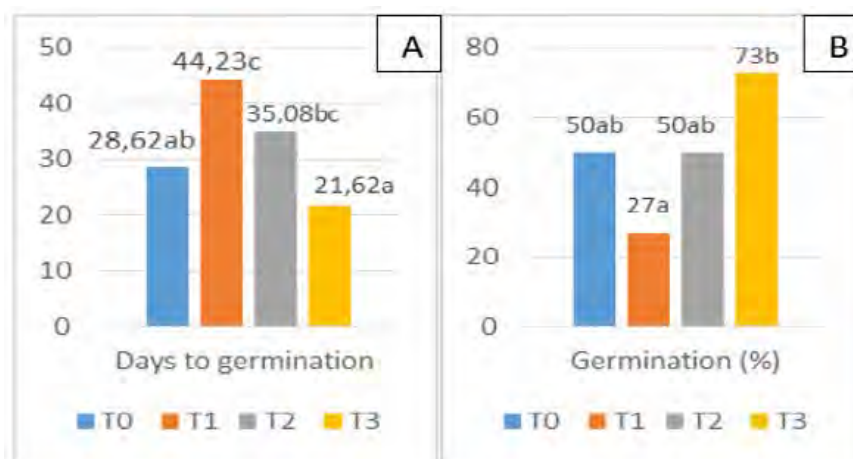


Figure 1. Effects of pregerminative treatments on *Solanum betaceum* seeds *in vitro*. A. Days to germination B. Germination percentage.

to pregerminative treatments that involved hydration of the seeds¹⁻³. In previous articles, it is pointed out that during the seed's imbibition, the meristematic activity is limited; however, preparation for cell division already occurs⁴. Hydro priming activates metabolic processes such as hydrolysis, the activation of enzymes, and the breaking of dormancy in seeds, favoring the expansion of the embryo and significantly decreasing the time of emergence of the radicle⁵. Treatment T3 shows a higher germination percentage than those presented by Murillo-Gómez, Hoyos, & Chavarriga⁶, who reported 57.5% of *Solanum betaceum* seeds germinated; these were scarified and seeded in MS medium with 3 ppm of BAP. This induced improvement in the germination process is based on hydro priming on the activation of DNA repairing mechanisms, synchronization of the cell cycle in the G2 phase, and cell division prepping⁷.

Although scarification was expected to optimize the germination response by facilitating water absorption, T2 did not show a better response than the control treatment, producing only 50 % of germination and 35.08 days to germination (Figure 1B). This fact agrees with authors who state that scarification can damage the embryo, abnormal seedlings, and dead seeds⁸. Furthermore, in most of the species studied, scarification was not the treatment that achieved 100% germination, requiring other pregerminative procedures, or the combination with other factors that break dormancy, such as lighting, refrigeration, thermal shock, among others⁹.

T1 showed the lowest germination percentage; this characteristic could be attributed to the amount of imbibition time, which was higher compared to the other treatments; Trigiano & Gray¹⁰, point out that an excess of the amount of water available in the imbibition can negatively affect the suppression of dormancy speed in germinated seeds *in vitro*; agreeing with Trimble¹¹. It indicates that imbibition of the seed initiates germination, in which water and oxygen are necessary to keep the process going. However, an excess of water around the seed can cause an insufficient oxygen supply for the cells that were growing and dividing rapidly, which would stop the germination process.

Number and color of leaves

Treatment T3 showed the highest number of leaves, with 2,31 leaves per explant, and the best color, with an average of 2,65, which means that the leaves presented a dark green color (Figure 2). The highest number of leaves (2,31) showed by T3 can be attributed to this treatment's advantage due to the early germination, which handed an advantage in metabolic and morphogenetic mechanisms to the *Vitro plants*. Early germination has been considered a characteristic to be avoided by some authors¹²; however, research works suggest that plants produced by induced early germination were not affected morphologically, and the germination time was favorably reduced¹³.

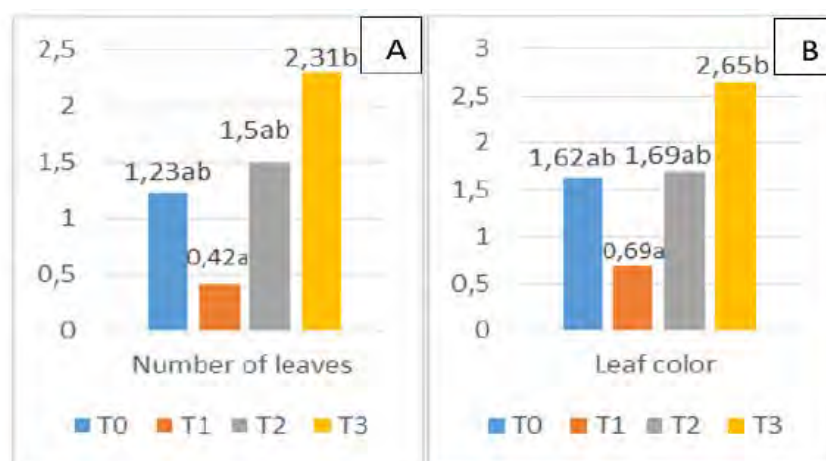


Figure 2. Effects of pregerminative treatments on *Solanum betaceum* seedlings *in vitro*. A. Number of leaves. B. Leaf in color.

A deep green color is considered a sign of health in *Solanum betaceum* plants. The color of the leaves of a plant is an indicator of health and vigor, as a deeper green indicates a higher concentration of chlorophyll, which allows higher efficiency in the transformation of solar energy into glucose¹⁴. Casierra-Posada, Peña-Olmos, & Ulrichs¹⁵, also conclude an essential link between coloration and the chlorophyll index. Due to insufficient chlorophyll content, a low-intensity green color in the leaf blade can signify stress or senescence in plants¹⁶. Besides that, the leaf's color is one of the main parameters for fruit producers, playing a crucial role in the choice, preference, and acceptability of the plants¹⁷.

Bacterial contamination

T1 was the only treatment that displayed bacterial contamination (42 %) (Figure 3A), this characteristic could be due to an exogenous microbial source that could have come into contact with the seeds when the changing of distilled water after

24 hours occurred (this process was not performed in the rest of the treatments); Farooq, Wahid, & Siddique¹⁸, consider the imbibition process with leachate washing as a possible source of contamination. Likewise, Ma¹⁹ indicates that storing seeds that keep their coverage under hydration generally maintains high microbial viability.

Conclusions

The best pregerminative treatment was T3 (imbibition for 24 hours), applied on *Solanum betaceum* seeds, showing an average of 21.62 days to germination, 73% germinated seeds, and 2.31 leaves with a deep green color (2.65/5).

Acknowledgments

To Jael Álvarez, Marco Pozo and Sebastián Pillalaza, for their great assistance in laboratory tasks.

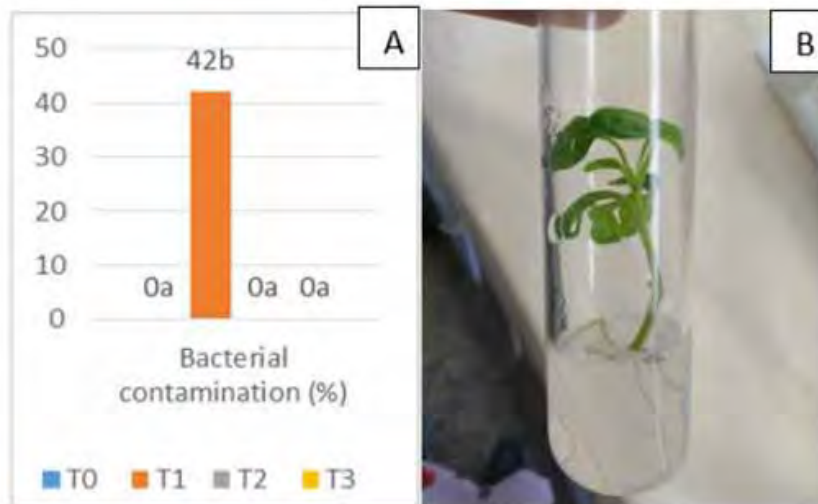


Figure 3. Effects of pregerminative treatments on *Solanum betaceum* in vitro. A. Bacterial contamination percentage. B. 45 days seedling.

Bibliographic references

1. Fallah S, Malekzadeh S, Pessarakli M. Seed priming improves seedling emergence and reduces oxidative stress in *Nigella sativa* under soil moisture stress. *J Plant Nutr.* 2018;41(1):29-40. doi:10.1080/01904167.2017.1381719
2. Górník K, Lahuta LB. Application of phytohormones during seed hydropriming and heat shock treatment on sunflower (*Helianthus annuus* L.) chilling resistance and changes in soluble carbohydrates. *Acta Physiol Plant.* 2017;39(5). doi:10.1007/s11738-017-2413-x
3. Noorhosseini SA, Jokar NK, Damalas CA. Improving Seed Germination and Early Growth of Garden Cress (*Lepidium sativum*) and Basil (*Ocimum basilicum*) with Hydro-priming. *J Plant Growth Regul.* 2018;37(1):323-334. doi:10.1007/s00344-017-9728-0
4. Lutts S, Benincasa P, Wojtyła L, et al. Seed Priming: New Comprehensive Approaches for an Old Empirical Technique. In: *New Challenges in Seed Biology - Basic and Translational Research Driving Seed Technology.* InTech; 2016. doi:10.5772/64420
5. Ogbuehi HC, Madukwe DK, Ashitonu P. ASSESSMENT OF HYDRO PRIMING OF SEEDS ON PERFORMANCE OF MORPHOLOGICAL INDICES OF BAMBARA GROUNDNUT (*VIGNA SUBTERRENEA* LINN.) LANDRACE. *Glob J Biol Agric Heal Sci.* 2013;2(2):17-22.
6. Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H. *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*, 3rd Edition. Vol 9781461446.; 2013. doi:10.1007/978-1-4614-4693-4
7. Murillo-Gómez PA, Hoyos R, Chavarriaga P. Organogénesis in-vitro usando tres tipos de tejidos de tomate de árbol [*Solanum betaceum* (Cav.)]. *Agron Colomb.* 2017;35(1):5-11. doi:10.15446/agron.colomb.v35n1.61330
8. Chaodumrikul S, Kaewson P, Chulaka P, Chanprasert W. Breaking seed dormancy in smooth loofah (*Luffa cylindrica* (L.) M. Roem.) using scarification and dry heat treatment. *Agric Nat Resour.* 2016;50(2):85-88. doi:10.1016/j.anres.2015.09.003
9. Bradbeer JW. *Seed Dormancy and Germination.* First. (Springer Science & Business Media, ed.); 2013. doi:10.1007/978-94-011-6574-7_8
10. Trigiano RN, Gray DJ. *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology.* 1st Editio. (Trigiano RN, Gray DJ, eds.). Boca Raton: CRC Press; 2016. doi:10.1201/9781439896143
11. Trimble S. *Encyclopedia of Water Science, Second Edition* (Print Version); 2007. doi:10.1201/noe0849396274
12. Hugo Cota-Sánchez J. Precocious Germination (Vivipary) in Tomato: A Link to Economic Loss? *Proc Natl Acad Sci India Sect B - Biol Sci.* 2018;88(4):1443-1451. doi:10.1007/s40011-017-0878-4
13. Flores HE, Sgrignoli PJ. In vitro culture and precocious germination of *Taxus* embryos. *Vitr Cell Dev Biol - Plant.* 1991;27(3):139-142. doi:10.1007/BF02632197
14. Zhang R, Ren Z, Sun J, Tang W, Ning D, Qian Y. Method for monitoring the cotton plant vigor based on the WSN technology. *Comput Electron Agric.* 2017;133:68-79. doi:10.1016/j.compag.2016.12.009

15. Casierra Posada F, Peña Olmos J, Ulrichs C. Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema II en plantas de fresa (*Fragaria* sp.) Afectadas por la calidad de la luz: implicaciones agronómicas. *Rev UDCA Actual Divulg Científica*. 2011;14(2). doi:10.31910/rudca.v14.n2.2011.774
16. Shankar A, Gupta RK, Singh B. Establishing indicator leaf and its threshold values for need based nitrogen management using chlorophyll meter and leaf color chart in Bt cotton. *J Plant Nutr*. 2019;42(2):186-201. doi:10.1080/01904167.2018.1551492
17. Sarker U, Oba S. Augmentation of leaf color parameters, pigments, vitamins, phenolic acids, flavonoids and antioxidant activity in selected *Amaranthus tricolor* under salinity stress. *Sci Rep*. 2018;8(1):12349. doi:10.1038/s41598-018-30897-6
18. Farooq M, Wahid A, Siddique KHM. Micronutrient application through seed treatments - a review. *J Soil Sci Plant Nutr*. 2012;12(1):125-142. doi:10.4067/S0718-95162012000100011
19. Ma Y. Seed coating with beneficial microorganisms for precision agriculture. *Biotechnol Adv*. 2019;37(7):107423. doi:10.1016/j.biotechadv.2019.107423

Received: 18 December 2020

Accepted: 10 January 2021

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Evaluación de la diversidad genética de una colección venezolana de morera mediante marcadores moleculares

Evaluation of the genetic diversity of a Venezuelan collection of mulberry using molecular markers

Ramón Rea¹, Sandy Molina-Moret¹, Darío Torrealba¹, Sabino Jiménez¹, Laura Gelves¹ y Daynet Sosa²

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.13

Resumen: La morera, *Morus alba* L. es un árbol leñoso, perenne de porte bajo a medio y de amplia adaptabilidad, tanto en áreas templadas como tropicales. Sus principales usos son en sericultura, alimentación animal y humana. El presente trabajo evaluó la diversidad genética de una colección de 28 entradas de morera usando marcadores moleculares ISSR. Los cinco iniciadores ISSR utilizados para la amplificación produjeron un total de 115 fragmentos polimórficos, con un tamaño entre 100-1800 pares de bases (pb), permitiendo la separación de cuatro grupos principales de diversidad, utilizando la disimilaridad debida al coeficiente de Dice y Análisis de Coordenadas Principales (ACoP). El primer grupo formado por las accesiones: Boconó-6, Maracay-1, Maracay-2, Maracay-3, Táchira-3, Táchira-4, Táchira-5 y Táchira-6; el segundo grupo por Boconó-3, Española-1, Murcia-1, Murcia-2, Murcia-3 y Yu-2; el tercer grupo por Boconó-1, Boconó-2, Maracay-6, Táchira-1, Táchira-2 y Yu-62 y el cuarto grupo por ACC-1, ACC-2, ACC-3, CGT-1, CGT-2, CGT-3, Española-3 y Española-7, con una diversidad genética de 0.242, 0.169, 0.230 y 0.219, respectivamente. Estos resultados constituyen una aproximación al conocimiento de la diversidad genética del cultivo en nuestro país, con fines de iniciar los programas de pre-mejora y mejora genética.

Palabras clave: ISSR, *Morus alba* L., sericultura, similitud genética.

Abstract: Mulberry, *Morus alba* L., is a woody, perennial tree of small to medium size and broad adaptability in temperate and tropical areas. Its main uses are in sericulture, animal, and human feeding. This work studied the genetic diversity of a Venezuelan collection of Mulberry by ISSR molecular markers. The five ISSR primers used for amplification produced 115 polymorphic fragments, with a size between 100-1800 base pairs (bp), allowing the separation of four major diversity groups using dissimilarity to the Dice coefficient and Principal Coordinates Analysis (PCoA). The first group formed by the accessions: Boconó-6, Maracay-1, Maracay-2, Maracay-3, Táchira-3, Táchira-4, 5-Táchira, Táchira-6; the second group by Boconó-3, Española-1, Murcia-1, Murcia-2, Murcia-3 and Yu-2; the third group by Boconó-1, Boconó-2, Maracay-6, Táchira-1, Táchira-2 and Yu-62 and the fourth group by ACC-1, ACC-2, ACC-3, CGT-1, CGT-2, CGT-3, Española-3 and Española-7, with genetic diversity of 0.242, 0.169, 0.230 and 0.219, respectively. These results provide a better knowledge of mulberry's genetic diversity in our country to initiate pre-breeding and breeding programs.

Key words: ISSR, *Morus alba* L., sericulture, genetic similarity.

Introducción

La morera (*Morus alba* L.) es un árbol leñoso, perenne de porte bajo a medio y de amplia adaptabilidad, tanto de áreas templadas como tropicales en Asia, Europa, Norte América, Sur América y África. La morera, género *Morus*, pertenece a la familia Moraceae, de las cuales hay al menos 24 especies conocidas¹. La morera es usada como única fuente de alimento para el gusano de seda *Bombix mori* en la sericultura. El follaje también es usado como alimento animal por su alto contenido nutritivo. En las regiones tropicales, la predisposición a utilizar el follaje de especies arbustivas para la producción animal ha estado vigente en los últimos años, y cobra importancia en respuesta al potencial de producción de nutrientes en las áreas, que se relaciona con altos niveles de proteína cruda (>18 %), alta digestibilidad, excelente balance de minerales y por la capacidad de producir forraje aún en época de sequía². En este sentido, trabajos recientes sugieren el uso del follaje de plantas arbustivas con potencial forrajero, como complemento alimenticio para corregir las carencias de nutrientes que presentan los pastos en las regiones tropicales. Una iniciativa para muchos países tropicales podría ser también la siembra densa de Morera para utilizarla como forraje³. Su uso como alimento comenzó a partir de la década del ochenta en América Central

debido a sus excelentes características bromatológicas⁴. En general *Morus alba* L., es una planta multifuncional con propiedades farmacológicas, con flavonoides como constituyentes principales, las hojas de morera poseen diversas actividades biológicas, que incluyen actividades antioxidantes, antimicrobianas, blanqueadoras de la piel, citotóxicas, anti-diabéticas, inhibidoras de glucosidasa, antihiperlipidémicas, antiateroscleróticas, antiobesidad, cardioprotectoras y de mejora cognitiva. Ricas en antocianinas y alcaloides, las frutas de morera tienen propiedades farmacológicas, como actividades antioxidantes, anti-diabéticas, antiateroscleróticas, antiobesidad y hepatoprotectoras. La corteza de la raíz de la morera, que contiene flavonoides, alcaloides y estilbenoides, tiene propiedades antimicrobianas, blanqueadoras de la piel, citotóxicas, antiinflamatorias y antihiperlipidémicas. El consumo de preparaciones de las hojas de morera controla comorbilidades relacionadas con la complejidad de la COVID-19 como la Diabetes mellitus tipo 1 y 2 y las enfermedades cardiovasculares^{5,6}. Todo esto adquiere relevancia para observar la evolución hacia cuadros complejos presentes en la severidad de la COVID-19, relacionada con una respuesta disfuncional del sistema inmune^{7,8}.

La evaluación del nivel y distribución de la diversidad ge-

¹ Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Caracas, Venezuela.

² Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Guayaquil, Ecuador.

Corresponding author: ramonrea@hotmail.com

nética dentro del germoplasma existente de morera, no solo puede contribuir al conocimiento sobre su historia evolutiva, sino que es fundamental para su conservación y mejora⁹. Se han desarrollado estudios previos sobre diversidad genética usando caracteres morfológicos y técnicas moleculares. Los marcadores moleculares son complementos útiles a los caracteres morfológicos y fenológicos debido a que son abundantes, independientes del tejido o de efectos ambientales y permiten identificar genotipos en estados iniciales de desarrollo de la planta. Estas técnicas revelan polimorfismos a nivel del ADN y son herramientas muy poderosas para la caracterización y estimación de la diversidad genética. En *Morus sp.*, se han usado exitosamente estos marcadores moleculares con fines de caracterización tanto de cultivares como de especies silvestres, así como de análisis de diversidad genética. Entre los marcadores moleculares empleados se tiene los RAPD-PCR (reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación al azar del ADN polimórfico)^{10,11}, AFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados)¹², SSR (secuencias simples repetidas)^{13,14}, siendo los ISSR (secuencias simples repetidas entre secuencias no repetitivas) los marcadores más comúnmente utilizados en *Morus sp.*, con diferentes propósitos, siendo los más destacados, la identificación de especies e incluso variedades intra-especie, así como también los estudios de diversidad y estabilidad genética^{15,16,17}.

En Venezuela, se ha iniciado un programa de aprovechamiento integral de la morera en diferentes áreas agroecológicas con fines de alimentación animal, humana y sericultura. La Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) ha recibido del Instituto Nacional de Investigaciones Científicas (IVIC) material colectado de siembra de diferentes localidades del país, desconociendo las relaciones genéticas entre ellas. En tal sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar la variabilidad genética de genotipos de morera colectados en Venezuela mediante marcadores ISSR.

Materiales y métodos

Material vegetal, extracción y amplificación del ADN

Se tomaron muestras de lo que inicialmente se consideraban 8 diferentes variedades de morera, cuyo origen no se conoce exactamente y se realizó la extracción de ADN de hojas jóvenes mediante el protocolo de Dellaporta¹⁸.

La cantidad y pureza del ADN extraído se midió en un espectrofotómetro Eppendorf BioPhotometer mediante la determinación de la relación de absorbancias 260/280 nm, y su integridad se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1X¹⁹. El ADN fue diluido a 1 ng/ μ L para las reacciones de amplificación de ISSR.

El análisis con los marcadores ISSR incluyó el uso de 5 iniciadores de 17-19 nucleótidos de longitud, desarrollados por el laboratorio de Biotecnología de la Universidad de la Columbia Británica (Tabla 1).

Para las reacciones de amplificación de ISSR-PCR se utilizaron: tampón de PCR 1X, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs (Promega Co. Ltd.), formamida al 2%, 0.25 μ M del iniciador en estudio, 2 U *Taq* polimerasa (Promega Co. Ltd.) y 2.5 ng de ADN genómico en un volumen final de 20 mL. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: (Tabla 2).

Todas las reacciones se realizaron en un termociclador Cycler (Bio-Rad). Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1X, mediante comparación con un marcador de peso

Iniciador ISSR	Secuencia de ADN*
ISSR-815	5'-CTC TCT CTC TCT CTC TG-3'
ISSR-823	5'-TCT CTC TCT CTC TCT CC-3'
ISSR-864	5'-ATG ATG ATG ATG ATG ATG-3'
ISSR-890	5'-VHV GTG TGT GTG TGT GT-3'
ISSR-891	5'-HVH TGT GTG TGT GTG TGT G-3'

Tabla 1. Lista de iniciadores de tipo ISSR seleccionados para la amplificación y evaluación de variedades de morera.

*Abreviaciones para posiciones de bases mezcladas: H= no G; V=no T.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	1 min	1
Desnaturalización	94	30 s	
Hibridación	50	30 s	30
Extensión	72	2 min	
Desnaturalización final	72	10 min	1

Tabla 2. Condiciones de amplificación de fragmentos ISSR utilizada.

molecular (1kb plus (Invitrogen) y fueron visualizados mediante un escáner Typhoon (GE Healthcare). La interpretación genética de los patrones de ISSR, esencialmente de naturaleza dominante, se basó en que solamente existen dos fenotipos, los que presentan la banda que son los individuos homocigotos dominantes y los heterocigotos y los que no la presentan que son los individuos homocigotos recesivos.

La nomenclatura utilizada consistió en señalar cada banda con el nombre y el número del iniciador comercial seguido de otro número que se refiere a la posición de la banda en el orden de menor a mayor migración en los geles.

Análisis de Datos

En ausencia de análisis de segregación no se hizo ningún supuesto sobre la naturaleza genética de los alelos, los fragmentos de amplificación fueron codificados de acuerdo a un marcador dominante, es decir, $A_1A_1=A_1A_2=1$ y $A_2A_2=0$, generando una columna por locus para cada iniciador. El nivel de polimorfismo y la capacidad discriminatoria de cada iniciador se valoró a través el contenido de información polimórfica (PIC) y la probabilidad de obtener parejas idénticas de alelos entre las muestras estudiadas²⁰. La colección venezolana de morera consta de nueve genotipos y de allí se tomaron 29 individuos; cuatro de Bocono, cuatro de Maracay, seis de Táchira, tres Española, tres Murcia, tres ACC, tres CGT, una Yu-2 y una YU-62. La relación genética entre los nueve genotipos fue estudiada aplicando el uso combinado del Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) y el Análisis de Conglomerados (AC), sobre datos de disimilitud utilizando los coeficientes de Jaccard, Emparejamiento simple, Dice y Rogers y Tanimoto²⁰. El número *k* de dimensiones a ser retenidas, el coeficiente de similitud que mejor define la estructura de los datos y las medidas de la calidad fueron calculados utilizando también los procedimientos descritos por Demey²⁰. Todos los análisis se realizaron utilizando InfoStat 2013²¹ e Info-Gen 2011²².

Resultados y discusión

Los cinco iniciadores ISSR utilizados para la amplificación produjeron un total de 134 fragmentos polimórficos, con un tamaño entre 100-1800 pares de bases (pb). Tamaños similares han sido descritos por otros autores quienes describen bandas amplificadas comprendidas entre 520-2200pb²³ y entre 200 - 2000pb¹.

El iniciador ISSR-815 fue el que generó el menor número de fragmentos amplificados (13 bandas) y el mayor número de fragmentos fue generado con el iniciador ISSR-823 (37 bandas). Otros autores, con el empleo de estos marcadores, han obtenido altos niveles de polimorfismo para *Morus sp.* Uno de los trabajos reporta que estudiando las relaciones genéticas entre 21 genotipos de morera y utilizando 11 iniciadores ISSR se obtuvo un 96.55% de bandas polimórficas²³. En otro estudio donde se evaluaron 20 genotipos con 8 iniciadores ISSR obtuvieron un 97.6 % de polimorfismo²⁴. Otro estudio donde utilizaron 11 ISSR obtuvieron un promedio de 91.78% de marcadores polimórficos¹. Sin embargo, también se han descrito niveles más bajos de polimorfismo para este género, aun cuando se plantea que existe más variabilidad genética entre genotipos de *M. alba* en contraste con la encontrada en otras especies como *M. nigra*^{12,25}. Así tenemos el polimorfismo de 91.3% descrito en 27 variedades de cultivo y silvestres de Morera con el empleo de 15 marcadores ISSR¹⁴; en genotipos colectados de diferentes países encuentran un 74.13% de polimorfismo con el empleo de 10 ISSR²⁶; otro estudio encuentra solo un 50% de polimorfismo entre 24 cultivares con el empleo de 17 marcadores¹³.

Los valores del Contenido de Información Polimórfica (PIC) para cada marcador ISSR variaron de 0.16 a 0.29; el marcador ISSR-891 fue el iniciador más informativo del conjunto, con un valor PIC mayor al 50% del intervalo teórico de 0.01 a 0.50 y además mostró la mayor capacidad discriminatoria, evaluada a través de la probabilidad de que dos variedades diferentes tengan igual identidad (Tabla 3).

En la figura 1, se muestra el espacio bidimensional obtenido del Análisis de Coordenadas Principales (ACoP), utilizando el coeficiente de similitud de Dice, que según la metodología de análisis propuesta, refleja la mayor coherencia entre la matriz de distancias observadas y estimadas, lo cual garantiza la mayor estabilidad de la representación y ofrece una mejor

aproximación de las relaciones entre las variedades. Las dos primeras dimensiones explican el 20% de la variabilidad total y permiten la formación de cuatro grupos de individuos utilizando los cinco iniciadores ISSR. El primer grupo formado por los individuos Boconó-6, Maracay-1, Maracay-2, Maracay-3, Táchira-3, Táchira-4, Táchira-5 y Táchira-6; el segundo grupo por Boconó-3, Española-1, Murcia-1, Murcia-2, Murcia-3 y Yu-2; el tercer grupo por Boconó-1, Boconó-2, Maracay-6, Táchira-1, Táchira-2 y Yu-62; y el cuarto grupo por ACC-1, ACC-2, ACC-3, CGT-1, CGT-2, CGT-3, Española-3 y Española-7, con una diversidad genética de 0.242, 0.169, 0.230 y 0.219, para el primero, segundo, tercer y cuarto grupo, respectivamente, lo cual ocurre con frecuencia ya que usualmente se utilizan especies seleccionadas por características similares de rendimiento y adaptación al ambiente. En términos de similitud, los resultados permiten probar que dos individuos con posiciones más contiguas en la representación bidimensional, tendrán patrones más similares de ADN respecto a los iniciadores utilizados.

Basados en los resultados obtenidos, no se puede afirmar que exista un patrón de agrupamiento debido a la procedencia de los individuos estudiados, similar a lo encontrado en el banco de germoplasma de Morera de la granja experimental "El Pilamo" de la Universidad Tecnológica de Pereira (Colombia), donde encontraron altos valores en los aspectos de estadística descriptiva y diferenciación poblacional que demuestran la gran complejidad presente en el genoma de morera¹⁷. Esto podría estar indicando el entrecruzamiento inducido por parte de los Fito mejoradores de variedades geográficamente distantes, lo que genera un acercamiento desde el punto de vista del material genético de los individuos.

A pesar de la similitud entre grupos, se nota que en el grupo 4 formado a partir de los ACoP, existe la predominancia de individuos de las variedades ACC y CGT, los cuales están ausentes en los demás grupos, por lo que se podría indicar que precisamente estas variedades, que en principio se creían distintas, pertenecen en realidad a un mismo grupo varietal de *M. alba* L. El conocimiento de las relaciones genéticas del material de partida es necesario para garantizar el uso adecuado del genoma de una especie cuando se pretende aplicar procesos de hibridación y selección en un programa de mejora genética.

Iniciador ISSR	Rango de Amplificación (pb)	Fragmentos Polimórficos	Contenido de Información Polimórfica	Probabilidad de Igual Identidad*
ISSR-815	470-950	13	0.22±0.03	7.2x10 ⁻¹²
ISSR-823	330-1800	37	0.16±0.02	5.2x10 ⁻¹⁰
ISSR-864	100-830	33	0.18±0.02	2.3x10 ⁻¹¹
ISSR-890	380-920	26	0.22±0.02	3.6x10 ⁻¹³
ISSR-891	520-1510	25	0.29±0.01	6.5x10 ⁻¹⁴
*Probabilidad de que dos individuos para el Loci evaluado tengan igual identidad				

Tabla 2. Nivel de polimorfismo y capacidad discriminatoria de los iniciadores.

*Probabilidad de que dos individuos para el Loci evaluado tengan igual identidad

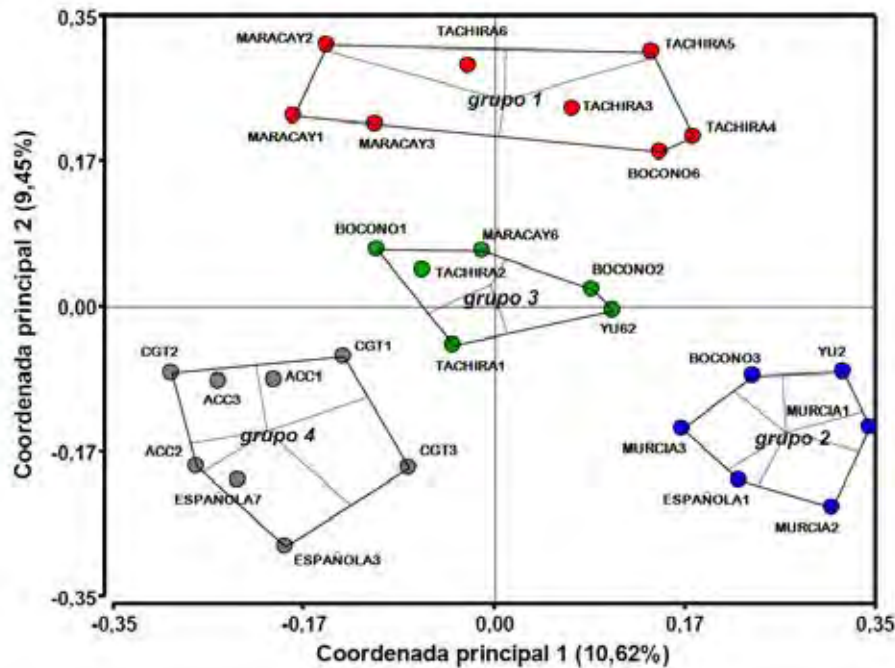


Figura 1. Relaciones genéticas entre los 28 individuos de la colección venezolana de morera basada en la disimilaridad debida al coeficiente de Dice y los cinco iniciadores ISSR.

Conclusiones

Los cinco marcadores ISSR evaluados no permitieron generar diferencias en el grupo genético debido a la procedencia de los individuos estudiados, lo que indica una baja variabilidad genética de morera en Venezuela. Es necesaria la inclusión en el estudio de nuevos marcadores ISSR y más genotipos para tener una mejor imagen de la estructura genética del germoplasma de *M. alba* L en Venezuela. Lo otro sería, la introducción de material foráneo de morera para aumentar la diversidad genética para futuros programas de mejora genética.

Acknowledgments

Al Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) y al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) por el apoyo y financiamiento para la ejecución de este trabajo.

Referencias bibliográficas

- Choudhary, R., R. Chaudhury, S. K. Malik, S. Kumar y D. Pal. 2013. Genetic stability of mulberry germplasm after cryopreservation by two-step freezing technique. *Afr. J. Biotechnol.* 12 (41): 5983-5993.
- Hove L., J.H Topps, S. Sibanda, L.R. Ndlovu. 2001. Nutrient intake and utilization by goats fed dried leaves of the shrub legumes *Acacia angustissima*, *Calliandra colothrusus* and *Leucaena leucocephala* as supplements to native pasture hay. *Anim. Feed Sci. Tech.* 91:95-106.
- Makkar, H. 2014. Aumento sostenible de la productividad del ganado mediante la utilización eficiente de los recursos alimenticios en países en vías de desarrollo. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(1): 55-58.
- Medina, M. G., D. E. García, T. Clavero, J. Iglesias y J.G. López. 2007. Evaluación inicial de la morera (*Morus alba* L.) en condiciones de vivero. *Zootecnia Tropi.* 25(1):43-49.
- Lown, Mark; Fuller, Richard; Lightowler, Helen; Fraser, Ann; Gallagher, Andrew; Stuart, Beth; Byrne, Christopher; Lewith, George. 2017. «Mulberry-extract improves glucose tolerance and decreases insulin concentrations in normoglycaemic adults: Results of a randomised double-blind placebo-controlled study». <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0172239>.
- Thaipitakwong Thanchanit, Surawej Numhom, y Pornanong Aramwit. (2018). «Mulberry leaves and their potential effects against cardiometabolic risks: A review of chemical compositions, biological properties and clinical efficacy». *Pharmaceutical Biology* 56(1): 109-18
- Wei-jie Guan, Zheng-yi Ni, Yu Hu, Wen-hua Liang, Chun-quan Ou, Jian-xing He, Lei Liu, Hong Shan, Chun-liang Lei, David, Hui, Bin Du, Lan-juan Li, et al. (2020). «Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China». *New England Journal of Medicine*: 1-13.
- Kwong, Paul C, y Yuan-chi Lin. (2020). «A strategy of traditional Chinese medicine against COVID-19: linking current basic research and ancient medicine texts». 13(2): 79-81.
- Banerjee, R., Chattopadhyay, S., y A. K. Saha (2016). Genetic diversity and relationship of mulberry genotypes revealed by RAPD and ISSR markers, *Journal of Crop Improvement*, DOI: 10.1080/15427528.2016.1177803.
- Zhao, W.G. y Y. Pan. (2004). Genetic Diversity of Genus *Morus* Revealed by RAPD Markers. *Int. J. Agri. Biol.*, 6(6):950-955.
- Manjula, A. C., Kote, N. V., Shivashankarappa, L. H., Vishwanatha, T., y Patil, A. G. (2020). Evaluation of genetic diversity amongst mulberry varieties *Morus alba* by RAPD marker. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 21(45-46), 138-145. Retrieved from <https://ikprress.org/index.php/PCMB/article/view/5510>
- Kafkas, S., M. Özgen, Y. Doğan, B. Özcan, S. Ercişli y S. Serçe. 2008. Molecular characterization of mulberry accessions in Turkey by AFLP markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133 (4): 593-597.
- Zhao, W. G., X. X. Miao, B. Zang, L. Zhang, Y. L. Pan y Y. P. Huang. 2006. Construction of Fingerprinting and Genetic Diversity of Mulberry Cultivars in China by ISSR Markers. *Acta Genetica Sinica.* 33 (9): 851-860.
- Zhao, W. G., Z. H. Zhou, X. X. Miao, Y. Zhang, S. B. Wang, J. H. Huang, H. Xiang, Y. L. Pan y Y. P. Huang. 2007. A comparison of genetic variation among wild and cultivated *Morus* species (*Moraceae*: *Morus*) as revealed by ISSR and SSR markers. *Biodivers. Conserv.* 16 (2): 275-290.
- Awasthi, A. K., G. M. Nagaraja, G. V., Naik, S., Kanginakudru, K., Thangavelu y J. Nagaraju. 2004. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. *BMC Genetics* 5: 1-9.
- Vijayan, K., A. Tikader, P. K. Kar, P. P. Srivastava, A. K. Awasthi, K. Thangavelu, B. Saratchandra. 2006. Assessment of genetic relationships between wild and cultivated mulberry (*Morus*) species using PCR based markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 53 (5): 873-882.

17. Gaviria-Arias, D., E. Aguilar-Fernández, H., Navia-Morocho y A. Alegría-Soto. 2012. Diversidad genética en el banco de germoplasma de morera [*Morus* spp. (Rosales: Moráceas)] de la granja experimental "el Pilamo", Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira (Risaralda), Colombia. *actual biol.* 34 (96): 33-42.
18. Dellaporta, S. L., J. Wood y J. B. Hicks. 1983. A plant DNA mini-preparation version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1 (4): 61-64.
19. Maniatis, T., E. F. Fritsch, y J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
20. Demey, J. R., J. L. Vicente-Villardón, M. P. Galindo-Villardón y A. Y. Zambrano. 2008. Identifying molecular markers associated with classification of genotypes by External Logistic Biplots. *Bioinformatics.* 24 (24): 2832-2838.
21. Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada y C. W. Robledo. *InfoStat* versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. En: <http://www.info-stat.com.ar>.
22. Balzarini, M. G. y J. A. Di Rienzo. *InfoGen* versión 2011. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. En: <http://www.info-gen.com.ar>.
23. Ipek, M., L. Pirlak y S. Kafkas. 2012. Molecular characterization of mulberry (*Morus* spp) genotypes via RAPD and ISSR. *J. Sci. Food Agric.* 92 (8): 1633-1637.
24. Chikkaswamy, B. K., R. C. Paramanik, A. Debnath y S. M. Sadana. 2012. Evaluation of Genetic Diversity in Mulberry Varieties Using Molecular Markers. *Nat. Sci.* 10 (6): 45-60.
25. Orhan, E. y S. Ercisli. 2010. Genetic relationships between selected Turkish mulberry genotypes (*Morus* spp) based on RAPD markers. *Genet. Mol. Res.* 9 (4): 2176-2183.
26. Srivastava, P. P., K. Vijayan, A. K. Awasthi y B. Saratchandra. 2004. Genetic analysis of *Morus alba* through RAPD and ISSR markers. *IJBT.* 3 (4): 527-532.

Received: 18 December 2020

Accepted: 10 January 2021

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Porous Sponges from the Mesocarp of *Theobroma Cacao* L. Pod Shells for Potential Biomaterial Applications

Sandra Heredia¹, Diego Costa², Iván Choez¹, Ana Barragan¹, María F. Quijano¹, Washington Cárdenas², Patricia Manzano¹, Carol Reyes³, Daynet Sosa¹, Jose F. Alvarez-Barreto^{3*}

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.14

Abstract: Lignocellulosic materials have garnered significant attention in recent years to generate biomaterials, but nothing has been investigated with cacao residues of significant importance in Ecuador. This study's objective was to generate porous, three-dimensional sponges from cacao pod shell mesocarp with potential use in biomaterial application. Discs from the mesocarp of cacao pod shells were subjected to neutral, acid, and alkaline treatments, at 25oC and 100oC, followed by washing and lyophilization. Sponge composition was evaluated, with the alkaline treatment resulting in the highest cellulose content and the lowest percentage of lignin, with the removal of hemicellulose corroborated by FITR. The sponges presented high water absorption capacities, which increased with the treatment temperature; mainly, the alkaline generated structures had the largest capacity. The sponges' porosity also depended on the treatment, with the acid and alkaline treatments generating larger pores, which significantly grew with treatment temperature. Preliminary *in vitro* cytotoxicity tests were carried out using Wharton's jelly mesenchymal stem cells, according to ISO 10993.5.2009, with none of the materials being cytotoxic; however, those with greater lignin contents resulted in lower cell viability. In general, it is considered that the alkaline generated sponges presented the more significant potential for biomaterial applications, which could be further tested with *In vitro* cell proliferation and differentiation studies and possible *in vivo* assays.

Key words: Cacao, lignocellulosic biomass, waste, biomaterials, valorization.

Introduction

Lignocellulosic biomass has been considered for varied technologies within a framework of its valorization. Applications include environmental as an adsorbent for water purification, biotechnological, microorganism substrates for different bioprocess, and biomedical as biomaterials. Secondary lignocellulosic biomass, derived from agro waste, is increasingly prevalent worldwide, and the novel was for its valorization is the focus of extensive research. Ecuador supports its economy mainly on agriculture, and essential crops include corn, tubers, and cacao. Regarding the latter, this country is essential for being one of the largest producers of fine-aroma varieties¹.

Nonetheless, due to this variety being prone to diseases and its low plant productivity, a clone, CCN51, has gained more preponderance among farmers, despite having more insufficient organoleptic properties². This last crop alone generates more than 200,000 tons of waste per year, with most of it being lignocellulosic material from the pod shell, which is mainly used for animal feed or as fertilizer in the same crop. However, these applications are inefficient since animals do not easily digest the material, and its potential as a fertilizer has not been demonstrated³.

The two main components of this type of residues, cellulose and lignin, are different commercial interests. On the one hand, cellulose can be digested to generate reducing sugars, used by different microorganisms to produce various metabolites, such as bioethanol, biogas, and lactic acid. On the other hand, lignin can be processed into materials used in constructions, among other areas. Lignocellulosic biomass has also been used as absorbent and adsorbent materials for oil, heavy metals, and other essential water contaminants. Moreover, both lignin and cellulose possess different cyto and biocompa-

tibility levels, making them suitable candidates for biomaterial applications, such as scaffolds for tissue engineering of controlled drug delivery systems^{4,5}.

Lignin and some of its derivatives have already been used in these applications, both alone or in combination with other materials, displaying high levels of cytocompatibility and the ability to support cell adhesion, proliferation, and differentiation^{4,6,7}. However, it has been reported that they can reach cytotoxic levels, which could hinder the potential application of lignocellulose-based biomaterials⁸. On the other hand, cellulose has been more widely employed, with applications in thin films, composite hydrogels, and three-dimensional porous scaffolds, among others. This polysaccharide has been combined with biopolymers such as chitosan, collagen, and alginate^{9,10}, with actual results in skin, bone, cartilage, and even nerve tissue engineering¹¹⁻¹³. However, they have been used separately and assembled in residual biomass for different biomedical applications. Scaffolds have been fabricated from lignocellulosic apple matrices through their chemical and enzymatic pretreatments. These constructs were efficient in supporting mesenchymal stem cell proliferation and differentiation¹⁴.

As the agricultural residue represented by cacao pod shells is rich in these biopolymers, we believe that it can be used to generate porous structures that could potentially be used as biomaterials. Thus, they would represent feasible alternatives to other biopolymers, both natural or synthetic, more commonly used in the fabrication of such matrices, namely chitosan, poly- α hydroxy esters, and alginate, among others¹⁵⁻²⁴.

¹ Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, CIBE, Guayaquil, Ecuador.

² Laboratorio para Investigaciones Biomédicas, FCV, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.

³ Biomaterials Laboratory, Institute for the Development of Alternative Energies and Materials, IDEMA, Department of Chemical Engineering, College of Sciences and Engineering, Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador

The valorization of the residue mentioned above as a bio-material has not been previously reported in the literature. As it has high contents of essential biopolymers (cellulose and lignin), we hypothesize that suitable structures for biomedical applications could be potentially generated. We believe that structures with a high cellulose and critical lignin composition levels could result in highly cytocompatible and stable structures. Thus, this study's objective was to establish an appropriate protocol for generating porous, three-dimensional sponges from cacao pod shell mesocarp and perform a preliminary assessment into their cytocompatibility properties that could translate into biomaterial applications. The mesocarp was chosen since other layers of the pod shells are either too woody and difficult to process or disintegrated quickly with any treatment²⁵.

Materials and methods

The general procedure used to generate the sponges and their subsequent characterization is shown in figure 1.

Mesocarp samples from cacao pod shells

CCN51 cacao pods were obtained from Guayas, Ecuador, always from the same location and similar maturation degree. The mesocarp was manually separated from the other layers of the shells, namely the endocarp and exocarp, and discs of 6.6 mm in diameter and 5.6 mm in thickness were obtained. Due to enzymatic darkening and accelerated oxidation, the samples were treated immediately.

Generation of porous sponges

The mesocarp samples were subjected to the treatments specified in Table 1. Briefly, a known mass of discs was suspended in the reagent solution (sodium hydroxide, acetic acid, or water) at a ratio of 1g per 15ml. Treatments were carried out at room temperature or 100°C. Those at room temperature were performed for 72 h, with changes in solution at 24 and 48h, stirring at 50 rpm, while those at 100°C were done in a reflux system for 3 h, with changes in solution at 1 and 2h. These times were based on previous laboratory trials. At room temperature, 3h did not result in significant changes in the structure, while longer times in the reflux system caused the samples' complete disintegration. After the treatment, the resulting samples were thoroughly rinsed with distilled water until neutralized, later frozen, and lyophilized.

Crude Fiber

An adaptation from the norm AOAC 989.03 was used²⁶. Briefly, 2 grams of defatted sample (previously treated in a Soxhlet system, using hexane) were treated with 1.25% sulfuric acid and 1.25% NaOH in reflux for 1h. Then, the sample was washed with distilled water and dried at 105°C for 2h. After weighing the dried sample, calcination followed at 500°C. Crude fiber (CF) content was determined through equation (1).

$$\%CF = \frac{(WT-WC)}{WS} * 100 \quad (1)$$

WT is the weight of the treated sample, WC is the weight after calcination, while WS represents the defatted sample.

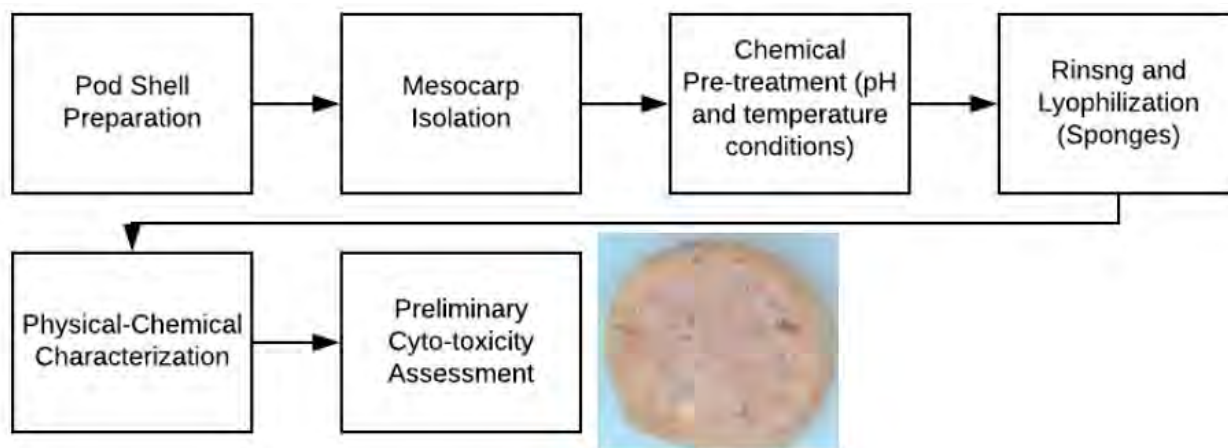


Figure 1. General experimental procedure for the generation and characterization of cacao mesocarp sponges. The stereoscopic picture presents an example of a generated sponge.

Treatment Type	Reagent	Concentration	Temperature	Time
Neutral	H ₂ O	-	25°C	72h
Neutral	H ₂ O	-	100°C	3h
Acid	CH ₃ COOH	1N	25°C	72h
Acid	CH ₃ COOH	1N	100°C	3h
Alkaline	NaOH	1N	25°C	72h
Alkaline	NaOH	1N	100°C	3h

Table 1. Experimental conditions of the different pretreatments applied to cacao mesocarp samples to obtain porous sponges

Ash Content

Norm AOAC 932.01 was followed. One gram of sample was calcinated at 700°C for 2h. Total ash content was determined through equation (2). Where WS and WC are the weights of the sample and after calcination, respectively.

$$\%TA = \frac{WC}{WS} * 100 \quad (2)$$

Cellulose Content

One gram of dried sample was digested in 15 mL of 80% acetic acid and 1.5mL of concentrated nitric acid, under reflux, for 20 min. The digested sample was then filtered and washed with ethanol, followed by drying at 105°C. Calcination followed at 540°C. Cellulose content was calculated through equation (3).

$$\%CC = \frac{(WT-WC)}{WS} * 100 \quad (3)$$

WT is the sample's weight after reflux, WC is the weight after calcination, while WS represents de defatted sample.

Lignin Content

According to AOAC 973.18, one gram of defatted sample was digested in 15 ml of 72% sulfuric acid, under moderate agitation for 2h, at room temperature. Then, the digested sample was taken to a reflux system with water for 4h, followed by filtration, thorough rinsing with water, and drying at 105°C for 3h. Equation (4) was used to determine the percentage of lignin in the sample.

$$\%LC = \frac{WF}{WI} * 100 \quad (4)$$

Where, WI and WF are the initial and final sample weights, respectively.

Water Absorption

To determine the water absorption capacity of the sponges, swelling assays were conducted. Lyophilized samples were placed in 24-well plates, incubated in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2), at 37°C. Sample weight was monitored over time, and the swelling degree was determined through equation (5).

$$\%SD = \frac{(W_t - W_0)}{W_0} * 100 \quad (5)$$

Where, W_0 is the initial weight, and W_t is the weight at a specific time, t.

Scanning Electron Microscopy, SEM

Foam morphology was analyzed in a Scanning Electron Microscope FEI, model INSPECT. For this, samples were sputter-coated with platinum and observed at 50 Pa and 7.5 KV. Pore size analyses were carried out using the software ImageJ^{27,28}.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR

Samples were analyzed with a Cary 630 FTIR Spectrometer from Agilent Technologies, with an ATR module, with an interval of 650cm⁻¹ to 4000 cm⁻¹ in wavelength.

Cytocompatibility Analyses

Cell viability was used as a preliminary test to assess the material's cytocompatibility; ISO 10993.5.2009 (Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity) was used for this purpose. Mesenchymal stem cells were isolated from the Wharton's Jelly of human umbilical cord after approval from the Bioethics Committee at Hospital Luis Vernaza, Guayaquil (Document number HLV-DOF-CEI-007, with date February 27, 2015). Cells from the third passage were plated in 96-well plates at 5x10³ cells/cm², and cultured over 24 h with Dulbecco's modified essential media (DMEM, supplemented with 10% fetal bovine serum, FBS and 1% penicillin-streptomycin). Sponge samples were disintegrated in non-supplemented DMEM at a 1mg/mL concentration and sterilized in an autoclave. The wells were then washed with phosphate buffer saline (PBS, pH 7.2), and processed sample suspensions were added. Control was used with only DMEM (without material). These were incubated, for 72h, in a humid atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. After that, wells were rinsed with PBS, and an MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide) solution with a concentration of 5 mg/ml, in PBS, was added, followed by incubation under culture conditions, for 3h. After that, dimethyl sulfoxide was added, and optical density was obtained in a spectrophotometer at 590nm. Cell viability was calculated through equation 6.

$$Cell\ viability = \frac{ODs}{ODc} * 100 \quad (6)$$

Where ODs and ODc are the optical densities of the sample and control, respectively.

Statistical Analyses

Results are reported as the average ± standard deviation. Four replicates were used unless otherwise specified. For crude fiber, ashes, cellulose, and lignin, averages from four different pods were reported. Statistically significant differences were determined through ANOVA, with multiple comparisons with Tukey, with a confidence level of 95%.

Results and Discussion

In the generation of porous structures, it was essential to assess which methods could result in more significant cellulose contents and lower lignin compositions. Breaking down lignin structure could provide greater porosity to the structure, an important architectural feature for biomaterial applications. Moreover, cellulose, for instance, is a highly cytocompatible polymer²⁰, while lignin, also cytocompatible⁴, albeit to a lesser degree⁸, has limited biodegradability²⁹. It is important to remember that this study aimed not to perform a thorough biological evaluation of the generated materials but to establish a methodology to obtain porous structures composed of biopolymers previously reported as cyto- and bio-compatible.

Being a lignocellulosic material, cacao mesocarp could represent a local alternative (in Ecuador and Latin America in general) for the generation of new biomaterials. Different treatments would cause composition changes, translating into different yields and altering the dimensions concerning the original sample, as shown in Table 2. Neutral treatments, independent of the temperature, had the most significant yields and the lowest reduction on sample dimensions. On the other hand, alkaline treatments resulted in the lowest yields and

largest reduction in dimensions: diameter, thickness, and volume. For all cases, these effects were more pronounced at 100°C, which consistently resulted in lower yields and more considerable volume reduction for 25°C. This could sign greater levels of removal of specific components of the mesocarp, organic, such as fiber, and inorganic in the form of ashes.

Crude fiber is primarily composed of cellulose, lignin, hemicellulose, and pectic compounds³⁰; however, it is merely used to assess their changes and not on the actual values of their contents. As seen in Figure 2, crude fiber content significantly increased with temperature. At 25°C, the neutral treatment produced the lowest amount of crude fiber, comparable to the untreated samples, while there were no significant differences between the acid and alkaline treatments, despite them having larger crude fiber content. At 100°C, on the other hand, it was the alkaline treatment that resulted in the largest percentage of crude fiber ($p < 0.05$).

Analyzing fiber components, lignin content for all different treatments is shown in Figure 3. The highest content of lignin, at both temperatures, was found in the acid treatment, reaching a maximum of approximately 50%. The lowest values were obtained with the alkaline treatment, reaching a minimum of about 20%, comparable to that of the untreated sample. In different lignocellulosic biomass types, it has been reported that alkaline conditions, especially with sodium hydroxide, resulting in lower lignin content.

Regarding cellulose content (Figure 4), there were significant increases in this parameter concerning temperature for all the applied treatments. At 25°C, water resulted in a cellulose content similar to that of the untreated mesocarp (approximately 29%), significantly lower than those of the acid and alkaline treatments, with the latter yielding the highest content. At 100°C, however, the acid treatment resulted in the lowest cellulose content, while the alkaline still produced the highest value of $(48.88 \pm 1.67) \%$.

The acid's primary purpose is the solubilization of hemicellulose, not quantified here, weakening the interactions between lignin and cellulose³¹. However, in this case, under the acid condition, the composition of lignin is significantly greater than that of the cellulose, which could be due to acid hydrolysis of the latter. On the other hand, the alkaline treatment is more directly related to lignin removal by inducing biomass swelling, decreasing crystallinity, and, consequently, rupturing its structure³². Water could have a similar effect, albeit smaller. This explains the differences in fiber content between treatments, but not when compared to the untreated mesocarp. As previously mentioned, this study did not quantify other biomass components, and some of them are present in significant amounts, such as hemicellulose, pectin, and reducing sugars. Their removal could alter compositions by any of the treatments, causing an increase in the percentage content of crude fiber, cellulose, and lignin.

Treatment Conditions	Yield (%)	Diameter (mm)	Thickness (mm)	Volume Reduction (%)
Neutral at 25°C	72.26±2.31	6.54±0.17	5.49±0.55	3.74±0.15
Neutral at 100°C	49.19±1.67	6.51±0.16	5.01±0.54	12.95±0.14
Acid at 25°C	35.15±1.82	6.36±0.17	5.00±0.79	17.09±0.18
Acid at 100°C	35.72±2.73	6.12±0.33	4.20±0.63	36.74±0.17
Alkaline at 25°C	28.53±0.34	6.15±0.29	4.97±0.72	22.94±0.18
Alkaline at 100°C	17.73±1.40	5.86±0.51	4.23±0.52	40.45±0.18

Table 2. Yield of treated mesocarp from cacao pod shell after different treatment conditions to produce porous sponges, along with their average dimensions.

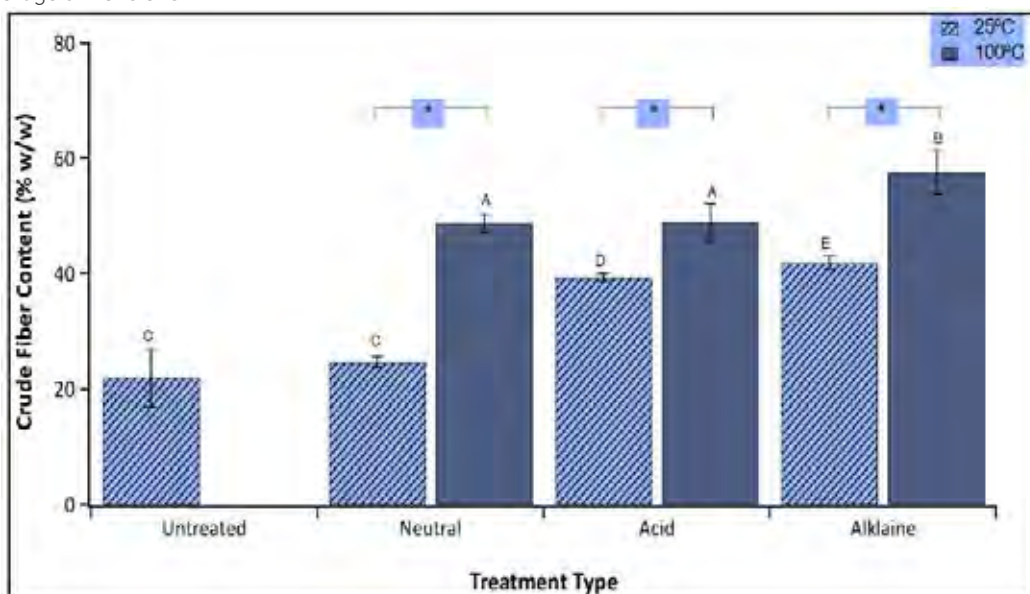


Figure 2. Crude fiber content of cacao mesocarp porous sponges generated by treatments with different reagents at different temperatures. * represents significant differences between the two temperatures. The same letters indicate that the values are statistically the same, while different letters denote differences ($p < 0.05$).

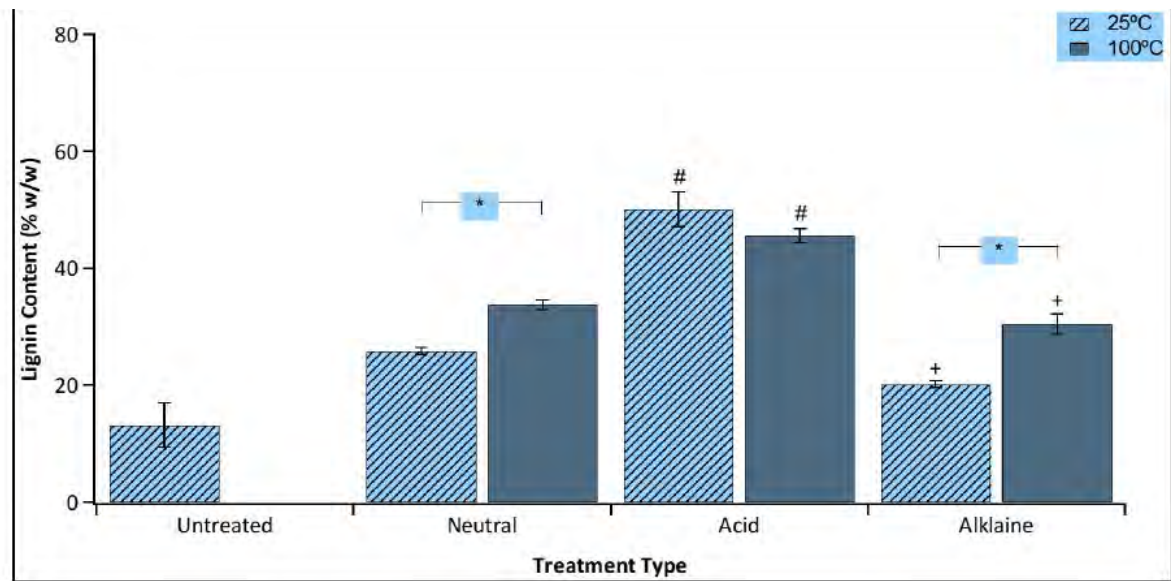


Figure 3. Lignin content of cacao mesocarp porous sponges generated by treatments with different reagents at different temperatures. * represents significant differences between the two temperatures. + And # the treatment type that resulted in the lowest and highest cellulose content, respectively, at a given temperature.

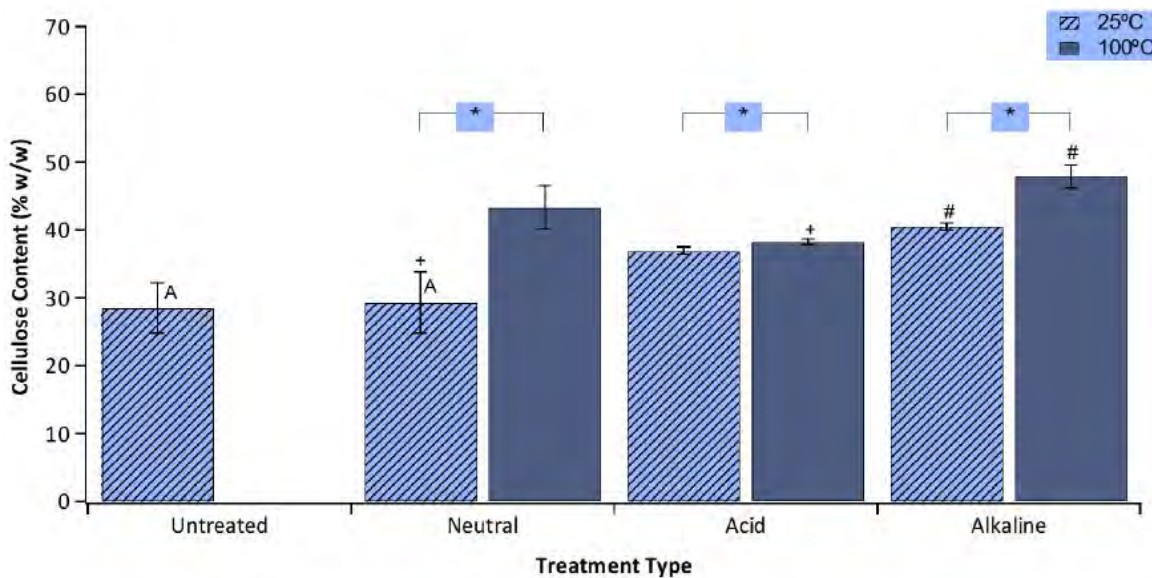


Figure 4. Cellulose content of cacao mesocarp porous sponges generated by treatments with different reagents at different temperatures. * represents significant differences between the two temperatures. The same letters indicate that the values are statistically the same. + And # the treatment type that resulted in the lowest and highest cellulose content, respectively, at a given temperature.

Another essential component of the biomass is represented by inorganic material in the form of ashes, presented in Figure 5 for the present study. The acid treatment resulted in the most efficient method to remove ashes, with up to 95% removal. Acetic acid is particularly efficient at this task, creating soluble acetate salts of calcium, magnesium, and potassium (among other cations)³³. On the other hand, the alkaline treatment could create insoluble hydroxides that could remain in the structure, even after washes.

FTIR analyses were carried out to confirm structural and compositional changes in the sponges, as shown in Figure 6. Characteristic hemicellulose peaks are observed at 1057 and 1090 cm^{-1} ³⁴, but the signal at 1270 cm^{-1} is significantly diminished in the sponges resulting from the alkaline treatment.

Cellulose peaks are also found in all samples, especially those at 1154 and 898 cm^{-1} . The untreated samples displayed all the characteristic peaks for lignin, including 1605 y 1517 cm^{-1} , corresponding to phenyl ring skeletal vibrations, and adsorption of aromatic methoxy groups at 2850 cm^{-1} ³⁵. These peaks were observed in the treated samples' spectra; however, the vibration of aromatic rings at 850 cm^{-1} disappeared with the alkaline treatment. A similar effect is observed with the absorbance of aldehyde/ketone groups at 1730 cm^{-1} . These results corroborate that the alkaline treatment is efficient at removing not only lignin but also hemicellulose.

Through changes in the composition, where lignin and cellulose levels varied significantly, it was essential to evaluate the sponges' water absorption capacity. This parameter

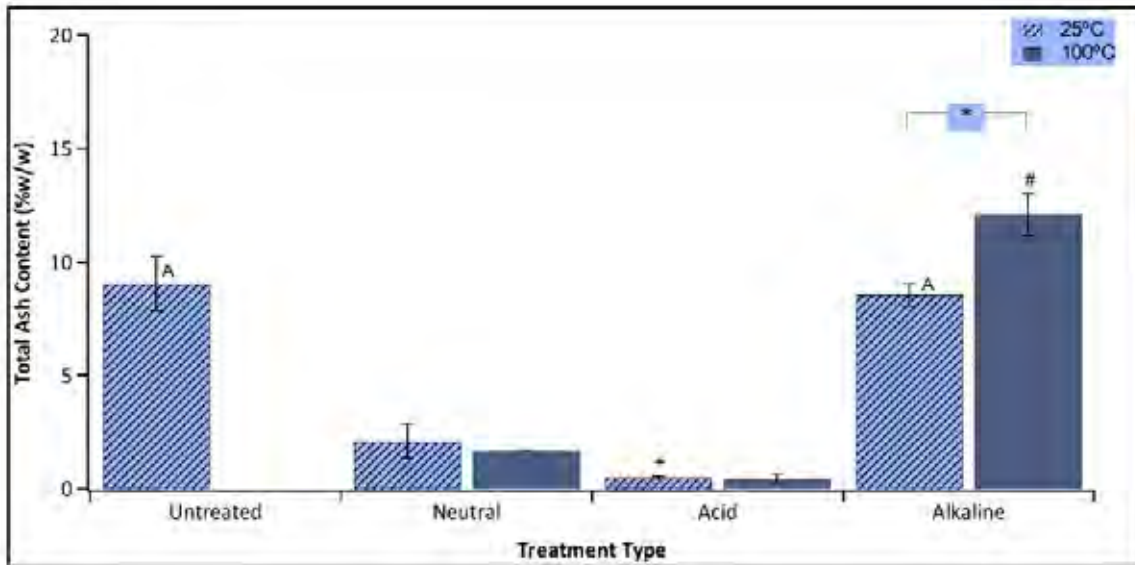


Figure 5. Ash content of cacao mesocarp porous sponges generated by treatments with different reagents at different temperatures. * represents significant differences between the two temperatures. The same letters indicate that the values are statistically the same. + And # the treatment type that resulted in the lowest and highest cellulose content, respectively, at a given temperature.

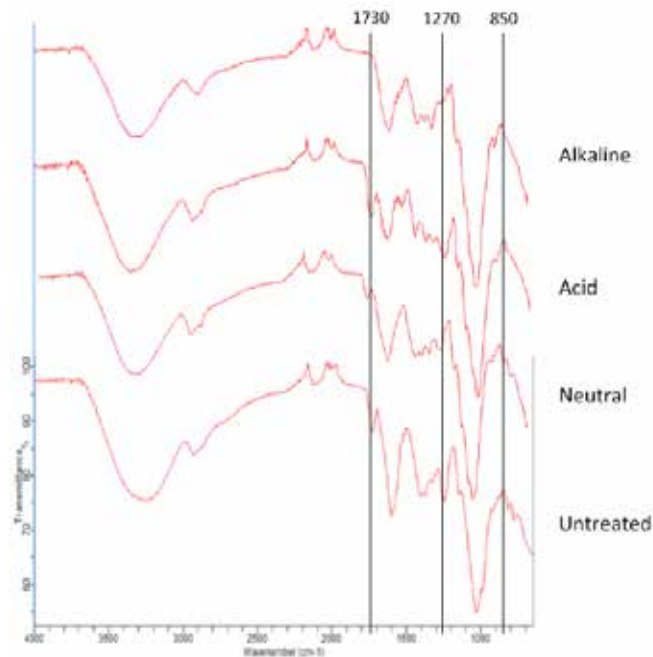


Figure 6. Fourier transform infrared spectra of the untreated samples and the sponges generated by neutral, acid and alkaline treatments.

is of upmost significance given that through the diffusion of nutrients in aqueous media (culture medium or blood), in potential tissue engineering applications, cell survival could be guaranteed³⁶. Figure 7 shows the water uptake capacity for the sponges generated through different treatments. At 25oC (Fig. 7A) and 100oC (Fig. 7B), the sponges resulting from the alkaline treatment presented the largest water absorption capacity, followed by those generated through acidic treatments, and those obtained by neutral treatment had the lowest capacities. Nevertheless, all the samples' swelling was remarkably high, more significant than that of the untreated mesocarp, which could give an idea of the sponges' large porosity. Over 80% of the water absorption occurred at 1h for all the studied formulations.

Additionally, the stabilization of the absorption, which was observed even after 72h, indicates that the structures are stable under physiological conditions. However, the materials without treatment presented an already high capacity to absorb water, and, at 25oC, there were no differences between this condition and those treated with water. However, for all treatments, water absorption significantly increased at 100oC, which was more pronounced for the scaffold resulting from the acid and water treatments.

The highest absorption capacity of the sponges obtained through alkaline treatment could be explained by their lowest lignin content, which is the component that gives rigidity to the biomass³⁷. The presence of hemicellulose is also an essential factor in lignocellulosic biomass stability and rigidity. Its pre-

sence was corroborated through FITR spectra; thus, this could be responsible for the lower values of water uptake levels presented by the scaffolds generated via water treatment. However, as seen in the spectra, hemicellulose levels seemed lower in the alkaline treated samples, translating into more flexibility of the structure and consequent higher water absorption capacity. As the temperature increases, the removal of hemicellulose and lignin becomes more effective, thereby providing less rigidity to the structure and allowing more significant water absorption levels. However, this large water absorption capacity could be an interesting characteristic for other applications, such as in environmental processes or microorganism immobilization for bioprocesses³⁸.

Close examination of sponge morphology could provide insights into alterations in composition and water absorption capacity. Changes in morphology can be seen in Figure 8, where untreated samples (Control) show micro-porosity, with apparent fibrous structures on its surface. The application of a neutral treatment, at 25oC, already induces a more generous definition of the micropores, but no significant changes in the structure are appreciable. This is corroborated through table 3, where average pore diameter and pore area distribution are shown. At 100oC, the porous structures become more extensive, with more excellent distribution. When treated with acetic

acid, changes on the surface are more prominent as it appears more irregular, and larger pores become more frequent, particularly at the higher temperature, when the average pore diameter is more extensive than those obtained at room temperature.

Nonetheless, when looking at the distribution, most pores have similar sizes at both temperatures. On the other hand, even larger pores are observed after the alkaline treatment, and the differences on pore size between room temperature and 100oC are significant this time. It is essential to highlight that there is more excellent uniformity in pore shape as they tend to be more grounded with the alkaline treatment at 100oC. The larger porosity observed with the acid and alkaline conditions can be related to the greater extent of mass and volume loss after the treatment, particularly for the latter; water absorption capacity is also related to this feature, as it is shown in the swelling studies. Similarities in morphology between the untreated and the sponges resulting from neutral conditions corroborate that this treatment did not change the material's structure. The average pore size is related to the change in sample dimensions after the treatment (Table 2). A more extensive loss of mass, which would translate into a more considerable volume reduction, could also be related to more excellent pores; thus, in the case of the treatments at

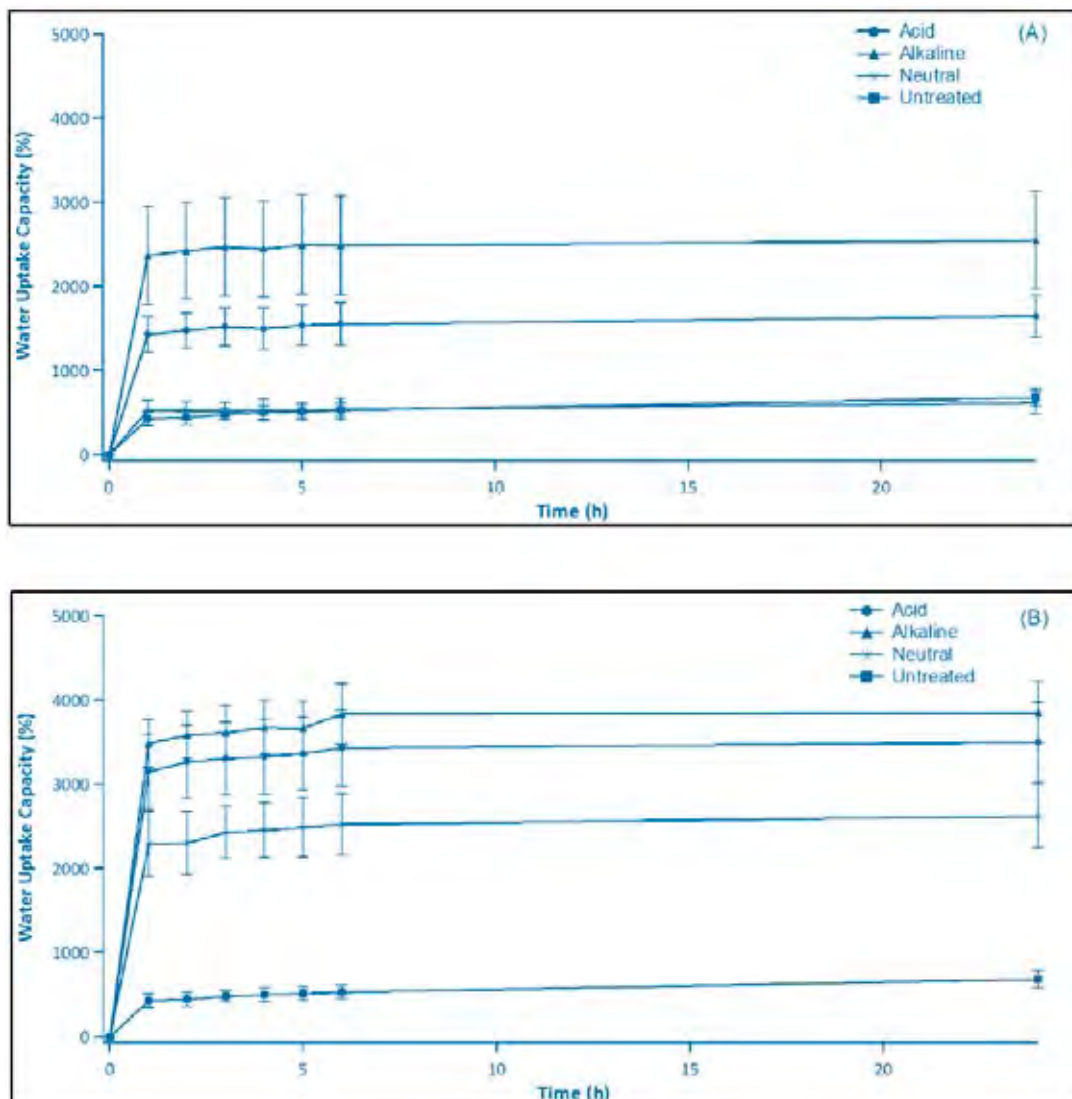


Figure 7. Water absorption kinetics of the sponges generated through different treatments at (A) 25°C and (B) 100°C.

100oC for acid and alkaline treatments, where pore areas are more extensive than in the other experimental conditions, there is also significantly greater volume reduction percentages (around 37 and 40%, respectively). On the other hand, it can be seen that, as there are no critical differences in pore size after neutral treatment at 25oC, the volume reduction is minimum (< 4%).

Porosity and pore size are essential parameters for biomaterial applications. For example, in the case of tissue engineering, the porous structure will be responsible for allowing cell migration and proliferation into the interior of the scaffold³⁹. Should cells be unable to penetrate the porous network, tissue regeneration would not be homogeneous, hindering the process's success. Many authors report that pore size should be in the range of 150-300 μm (approximately 17000-70000 μm^2) to permit efficient cell proliferation and migration and synthesis of extracellular matrix and the subsequent formation of new tissue⁴⁰. Nutrient transport would be guaranteed in any of the sponges due to their large water absorption capacity, but not all of them would be suitable for cell activity. From these results, it is apparent that the scaffolds obtained via alkaline treatment would be more appropriate for this purpose.

Table 4 shows the preliminary analysis of different sponges' cytocompatibility; in this case, only those at 100oC were chosen as they were considered the ones with the most significant potential for the proposed application. Only those formulations that yielded cell viability values greater than 70% would be considered potentially cytocompatible⁴¹. It is essential to point out that no changes in culture media were observed, indicating no pH variations due to the samples. Sponges

after alkaline and neutral treatment resulted cytocompatible. However, the untreated samples displayed viability greater than 100%, possibly due to the presence of compounds that could interfere with the MTT protocol and the formation of the purple formazan salts. The acid-produced sponges were not cytotoxic; however, the values were close to the limit established by the norm, and thereby they would not be recommended for further cell studies.

Material's cytotoxicity is directly related to its composition, and, in this case, some trends arise. As previously mentioned, lignin content can reach cytotoxic levels, partially explaining why the acid-generated sponges yielded the lowest cell viability. Additionally, those samples that resulted from the alkaline treatment and those from the neutral and untreated sample had significantly lower lignin contents and, at the same time, higher cell viability percentages. Regarding cellulose, however, the values in its content, despite being significantly different, are not large enough to mark a trend related to cytotoxicity. One interesting point is ash content; in this study, the untreated samples and those treated under alkaline conditions presented the highest ash percentages, but that was not the case with those from the neutral treatment. Thus, there is no clear trend between ash content and cell viability, nor is there a relation between crude fiber and this parameter. Consequently, it may be implied that lignin content will have a greater effect on cell viability when analyzing the scaffold composition. As this is a preliminary test, to determine the potential biomedical applications of these materials, such as tissue engineering, further analyses are recommended in future studies, including cell proliferation and differentiation.

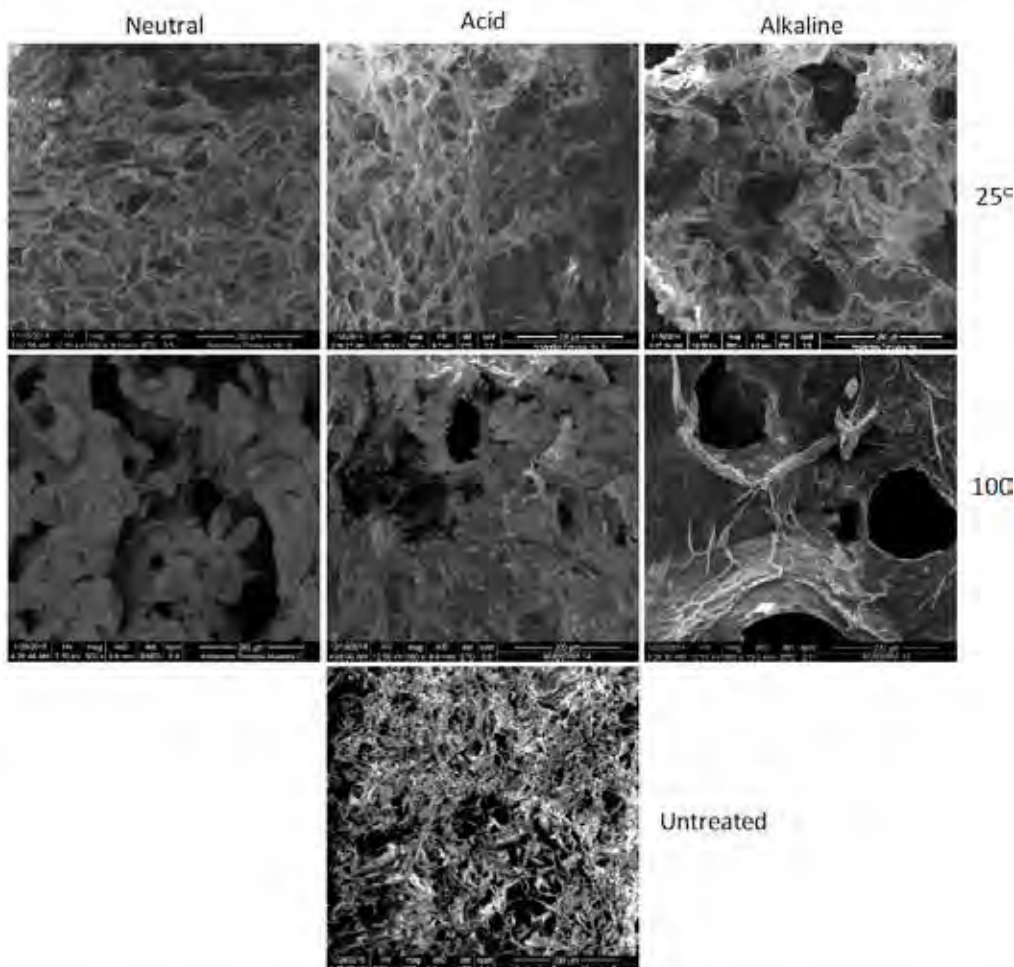


Figure 8. Scanning electron micrographs of mesocarp sponges from cacao pod shell, generated through different treatments. Magnification: 500X, Scale bar: 200 μm .








Treatment	Pore Size	
	Average Pore Diameter (µm)	Pore Area (µm ²) Distribution
Untreated	13	
Neutral at 25°C	14	
Neutral at 100°C	18	
Acid at 25°C	49	
Acid at 100°C	131	
Alkaline at 25°C	52	
Alkaline at 100°C	169	

Table 3. Pore size analysis of cacao mesocarp sponges obtained through different treatments

Treatment Condition	Cell Viability (%)
Untreated	106.64 ± 9.19
Neutral*	94.72 ± 9.45
Acid*	76.79 ± 5.13
Alkaline*	90.96 ± 3.54
* Treatment at 100°C.	

Table 4. Cytocompatibility analysis of cacao mesocarp sponges using human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell cultures

Conclusions

The present study tries to give an alternative to residual biomass valorization by generating highly specialized products that could potentially have an unusual application for this type of material. The results herein presented show that porous sponges, potentially cytocompatible, can be easily obtained through the chemical processing of the mesocarp from cacao pod shells. Of the tested methods, the alkaline treatment shows more significant promise for this application due to the

structural changes that result in greater porosity, water absorption capacity, and an indication of low cytotoxicity levels. Nevertheless, in future studies, it would be advisable to optimize the sponge generation process through alkaline treatments, where different variables can be assessed, such as reagent concentration, temperature, and time, among others. Further *in vitro* studies for cell attachment, proliferation and differentiation would also be necessary.

Acknowledgments

We would like to thank the Cell and Organ Transplant Unit at Hospital Luis Vernaza, Guayaquil, Ecuador, for their generous support in gathering the umbilical cords for mesenchymal cell isolation.

Funding Information

This study was funded by the National Secretary of Science and Technology (SENESCYT, Ecuador) via its PROMETEO Program. Additional funding was possible through the Collaboration Grant Program at Universidad San Francisco de Quito.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflicts of interest regarding this work.

Bibliographic references

- Vargas Jentzsch, P., Ciobotă, V., Salinas, W., Kampe, B., Aponte, P.M., Rösch, P. et al. (2016). Distinction of Ecuadorian varieties of fermented cocoa beans using Raman spectroscopy. *Food Chem*, 211: 274–280.
- Chetschik, I., Kneubühl, M., Chatelain, K., Schlüter, A., Bernath, K., Hühn, T. (2018). Investigations on the Aroma of Cocoa Pulp (*Theobroma cacao* L.) and Its Influence on the Odor of Fermented Cocoa Beans. *J Agric Food Chem*, 66(10): 2467–2472.
- Jiménez Ramírez, O.A., Mantilla Badillo, C.L. (2016). Aprovechamiento de la cascara de mazorca de cacao En la elaboración de carbono activo Para el tratamiento de aguas residuales. <http://repositorio.uts.edu.co:8080/xmlui/handle/123456789/2691> (accessed 14 Dec 2018).
- Farhat, W., Venditti, R., Mignard, N., Taha, M., Becquart, F., Ayoub, A. (2017). Polysaccharides and lignin based hydrogels with potential pharmaceutical use as a drug delivery system produced by a reactive extrusion process. *Int J Biol Macromol*, 104(Pt A): 564–575.
- Fekete, T., Borsa, J., Takács, E., Wojnárovits, L. (2017). Synthesis of carboxymethylcellulose/starch superabsorbent hydrogels by gamma-irradiation. *Chem Cent J*, 11(1): 46.
- Thakur, V.K., Thakur, M.K. (2015). Recent advances in green hydrogels from lignin: a review. *Int J Biol Macromol*, 72: 834–847.
- Jiang, P., Sheng, X., Yu, S., Li, H., Lu, J., Zhou, J. et al. (2018). Preparation and characterization of thermo-sensitive gel with phenolated alkali lignin. *Sci Rep*, 8(1): 14450.
- Nakasone, K., Kobayashi, T. (2016). Cytocompatible cellulose hydrogels containing trace lignin. *Mater Sci Eng C* doi:10.1016/j.msec.2016.03.108.
- de Araújo Júnior, A.M., Braido, G., Saska, S., Barud, H.S., Franchi, L.P., Assunção, R.M.N. et al. (2016). Regenerated cellulose scaffolds: Preparation, characterization and toxicological evaluation. *Carbohydr Polym*, 136: 892–898.
- Shaheen, T.I., Montaser, A.S., Li, S. (2019). Effect of cellulose nanocrystals on scaffolds comprising chitosan, alginate and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*, 121: 814–821.
- Chicone, G., de Carvalho, V.F., Paggiaro, A.O. (2018). Use of Oxidized Regenerated Cellulose/Collagen Matrix in Chronic Diabetic Foot Ulcers. *Adv Skin Wound Care*, 31(2): 66–71.
- Isobe, N., Komamiya, T., Kimura, S., Kim, U.-J., Wada, M. (2018). Cellulose hydrogel with tunable shape and mechanical properties: From rigid cylinder to soft scaffold. *Int J Biol Macromol*, 117: 625–631.
- He, X., Xiao, Q., Lu, C., Wang, Y., Zhang, X., Zhao, J. et al. (2014). Uniaxially Aligned Electrospun All-Cellulose Nanocomposite Nanofibers Reinforced with Cellulose Nanocrystals: Scaffold for Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 15(2): 618–627.
- Modulevsky, D.J., Lefebvre, C., Haase, K., Al-Rekabi, Z., Pelling, A.E. (2014). Apple Derived Cellulose Scaffolds for 3D Mammalian Cell Culture. *PLoS One*, 9(5): e97835.
- Diban, N., Gómez-Ruiz, B., Lázaro-Díez, M., Ramos-Vivas, J., Ortiz, I., Urtiaga, A. (2018). Factors Affecting Mass Transport Properties of Poly(ϵ -caprolactone) Membranes for Tissue Engineering Bioreactors. *Membranes* (Basel), 8(3): 51.
- Alvarez-Barreto, J.F., Shreve, M.C., Deangelis, P.L., Sikavitsas, V.I. (2007). Preparation of a functionally flexible, three-dimensional, biomimetic poly(L-lactic acid) scaffold with improved cell adhesion. *Tissue Eng*, 13(6). doi:10.1089/ten.2006.0330.
- Wang, X., Salick, M.R., Gao, Y., Jiang, J., Li, X., Liu, F. et al. (2018). Interconnected porous poly(ϵ -caprolactone) tissue engineering scaffolds fabricated by microcellular injection molding. *J Cell Plast*, 54(2): 379–397.
- Carfi Pavia, F., Ciappa, M., Lepedda, A., Fiorentino, S., Rigogliuso, S., Brucato, V. et al. (2017). A poly-L-lactic acid/ collagen/glycosaminoglycan matrix for tissue engineering applications. *J Cell Plast*, 53(5): 537–549.
- Sabourian, P., Frounchi, M., Dadbin, S. (2017). Polyvinyl alcohol and polyvinyl alcohol/ polyvinyl pyrrolidone biomedical foams crosslinked by gamma irradiation. *J Cell Plast*, 53(4): 359–372.
- Naseri-Nosar, M., Ziora, Z.M. (2018). Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites. *Carbohydr Polym*, 189: 379–398.
- Skopinska-Wisniewska, J., Wegrzynowska-Drzymalska, K., Bajek, A., Maj, M., Sionkowska, A. (2016). Is dialdehyde starch a valuable cross-linking agent for collagen/elastin based materials? *J Mater Sci Mater Med*, 27(4): 67.
- Kamoun, E.A. (2016). N-succinyl chitosan–dialdehyde starch hybrid hydrogels for biomedical applications. *J Adv Res*, 7(1): 69–77.
- Zhao, S., Liu, Z.-X., Gao, H., Wu, Y., Fang, Y., Wu, S.-S. et al. (2015). A three-dimensional culture system using alginate hydrogel prolongs hatched cattle embryo development in vitro. *Theriogenology*, 84(2): 184–192.
- Sívoli, L., Pérez, E., Caraballo, D., Rodríguez, J., Rodríguez, D., Moret, J. et al. (2013). Cytocompatibility of a matrix of methylated cassava starch and chitosan. *J Cell Plast*, 49(6): 507–520.
- Forero Nuñez, C.A., Jochum, J., Sierra-Vargas, F.E., Sierra-Vargas, F.E. (2015). Effect of particle size and addition of cocoa pod husk on the properties of sawdust and coal pellets. *Ing e Investig*, 35(1): 17–23.
- Barton, F.E., Windham, W.R. Determination of acid-detergent fiber and crude protein in forages by near-infrared reflectance spectroscopy: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem*, 71(6): 1162–7.
- Salerno, A., Zeppetelli, S., Maio, E. Di Iannace, S., Netti, P.A. (2010). Novel 3D porous multi-phase composite scaffolds based on PCL, thermoplastic zein and ha prepared via supercritical CO₂ foaming for bone regeneration. *Compos Sci Technol*, 70(13): 1838–1846.
- Trujillo-de Santiago, G., Portales-Cabrera, C.G., Portillo-Lara, R., Araiz-Hernández, D., Del Barone, M.C., García-López, E. et al. (2015). Supercritical CO₂ foaming of thermoplastic materials derived from maize: proof-of-concept use in mammalian cell culture applications. *PLoS One*, 10(4): e0122489.
- Garrison, T.F., Murawski, A., Quirino, R.L. (2016). Bio-Based Polymers with Potential for Biodegradability. *Polymers* (Basel), 8(7). doi:10.3390/polym8070262.
- Norman, A.G. (1935). The Composition of Crude Fibre. *J Agric Sci*, 25(04): 529.
- Bušić, A., Mardetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić Šantek, M. et al. (2018). Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. *Food Technol Biotechnol*, 56(3): 289–311.
- Menezes, E.G.T., do Carmo, J.R., Alves, J.G.L.F., Menezes, A.G.T., Guimarães, I.C., Queiroz, F. et al. (2014). Optimization of alkaline pretreatment of coffee pulp for production of bioethanol. *Biotechnol Prog*, 30(2): 451–462.
- Torget, R., Walter, P., Himmel, M., Grohmann, K. (1991). Dilute-Acid Pretreatment of Corn Residues and Short-Rotation Woody Crops. *Appl Biochem Biotechnol*, 28–29(1): 75–86.
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D.H., Zheng, C. (2007). Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, 86(12–13): 1781–1788.

35. Rana, R., Langenfeld-Heyser, R., Finkeldey, R., Polle, A. (2010). FTIR spectroscopy, chemical and histochemical characterisation of wood and lignin of five tropical timber wood species of the family of Dipterocarpaceae. *Wood Sci Technol*, 44(2): 225–242.
36. Leddy, H.A., Awad, H.A., Guilak, F. (2004). Molecular diffusion in tissue-engineered cartilage constructs: Effects of scaffold material, time, and culture conditions. *J Biomed Mater Res*, 70B(2): 397–406.
37. LISPERGUER, J., PEREZ, P., URIZAR, S. (2009). structure and thermal properties of lignins: characterization by infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *J Chil Chem Soc*, 54(4): 460–463.
38. Liu, S., Xu, Y., Zhao, Y., Zou, L., Lu, W. (2019). Hydrothermal modification of lignocellulosic waste as microbial immobilization carriers for ethanol production. *Biochem Eng J*, 142: 27–33.
39. Alvarez-Barreto, J.F., Sikavitsas, V.I. (2007). Improved mesenchymal stem cell seeding on RGD-modified poly(L-lactic acid) scaffolds using flow perfusion. *Macromol Biosci*, 7(5). doi:10.1002/mabi.200600280.
40. Wang, Y., Tomlins, P.E., Coombes, A.G.A., Rides, M. (2010). On the Determination of Darcy Permeability Coefficients for a Microporous Tissue Scaffold. *Tissue Eng Part C Methods*, 16(2): 281–289.
41. Hartje, L.F., Bui, H.T., Andales, D.A., James, S.P., Huber, T.R., Snow, C.D. (2018). Characterizing the Cytocompatibility of Various Cross-Linking Chemistries for the Production of Biostable Large-Pore Protein Crystal Materials. *ACS Biomater Sci Eng*, 4(3): 826–831.

Received: 25 November 2020

Accepted: 15 January 2021

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Analysis of *Pseudocercospora fijiensis* genes upregulated during early interaction with *Musa acuminata* (var. Dwarf Cavendish)

Bartolomé Chí Manzanero¹, Karla Gisel Carreón Anguiano¹, Jewel Nicole Anna Todd¹, Rufino Gómez Tah¹, Rosa Grijalva Arango², Miguel A. Tzec Simá³, Blondy Canto Canché^{1*}

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.15

Abstract: *Pseudocercospora fijiensis* is a filamentous, hemi biotrophic fungus whose infection process in banana comprises biotrophic and necrotrophic phases; the biotrophic phase is the longer and less damaging of the two but is nonetheless a crucial stage of fungal establishment in the host. To discover the genes essential in this stage, we conducted an interaction experiment to isolate the transcriptome of the *P. fijiensis* and *Musa acuminata* interaction during the first 9 days of infection. Of more than 7000 *P. fijiensis* genes identified, the fifteen most highly expressed genes (RPKM>500) were analyzed, and *in silico* characterization, they were able to identify specific non-canonical effector candidates that may be fundamental to pathogenicity. This report reveals essential details of a poorly-elucidated stage of the *P. fijiensis*-*Musa sp.* pathosystem.

Key words: *Pseudocercospora fijiensis*, transcriptomics, biotrophic stage, upregulated genes, effectors.

Introduction

Banana is the seventh most crucial crop globally, and its production is seriously affected by multiple pests and diseases. One of the most devastating diseases is the Black Leaf Streak disease, commonly known as Black Sigatoka, caused by *Pseudocercospora fijiensis*. This fungus can cause severe damage to plant foliar tissue, diminishes the plant's photosynthetic capacity, and reduces fruit yields. Fungal infection can result in total plant death, and producers incur substantial losses of up to 100% in some cases^{1,2}.

P. fijiensis is considered the most virulent species of the Sigatoka complex, which comprises the fungi *P. musae*, *P. eumusae* and *P. fijiensis*³. The infection begins when newly released fungal spores contact the banana plant's leaves and germinate on the leaf surface within 2 to 3 hours. Environmental conditions that are wet and humid are required for germination. The resulting germ tube grows epiphytically on the leaf surface for 2 to 3 days before it penetrates the leaf stomata through its formed appendages, the appressoria or stomatopodia⁴. Other reports have given a faster timeline; in greenhouse conditions, the germ tube formed within 6 hours and penetrated the stomata after 12 to 15 hours⁵. *P. fijiensis* has to complete two stages of its infection as a hemibiotrophic fungus: biotrophic and necrotrophic stages. In the biotrophic phase, the pathogen exclusively colonizes the intercellular spaces between mesophyll cells and obtains nutrients from the host apoplast without forming feeding structures called haustoria. The fungus remains in this phase for 3 to 4 weeks before entering the aggressive necrotrophic phase, marked by the appearance of the characteristic black, necrotic spots, then streaks formed on the leaves of the infected plant⁶.

In recent years, different studies have been done to understand the banana-P better *P.fijiensis* interaction. Although many omic technologies have been developed, very little is known of what occurs during the plant's early-stage *P. fijiensis* infection. Gene expression analysis is useful for the identification of genes involved in the plant-pathogen interaction. In one of the earliest studies of *P. fijiensis* gene expression, cDNA li-

braries of *P. fijiensis* grown in different *in vitro* conditions were compared to identify pathogenicity-related genes in the *P. fijiensis*-*Musa sp.* Interaction⁷. More recently, a group of small, cysteine-rich proteins called effectors has received particular attention in *P. fijiensis*; several effectors have been predicted: 172 sequences by Arango-Isaza *et al.*, 105 sequences by Chang *et al.*, and 136 sequences by Carreón-Anguiano *et al.*^{3,8,9}. As a hemibiotroph, it is expected that *P. fijiensis* would produce effector proteins and toxic secondary metabolites to manipulate the defense response of the host during late interaction, as well as prevent host cell death during the fungal biotrophic phase. Noar and Daub10 studied gene expression data of *P. fijiensis* in 6-week infected leaves, in comparison with *P. fijiensis in vitro* monoculture, resulting in interesting and valuable information about the necrotrophic phase of the infection. However, the fungus' repertoire during the biotrophic infection stage is yet to be elucidated. Studying the biotrophic phase of infection is challenging due to the limited quantity of biomass produced by this relatively slow-growing fungus.

In this study, a transcriptome corresponding to the first 9 days of infection of banana cv. Dwarf Cavendish with *P. fijiensis* was analyzed to uncover pathogen genes that were upregulated at the initial (biotrophic) stage of this plant-pathogen interaction.

Materials and methods

Plant growth conditions

Seedlings were obtained from *in vitro* culture in the proliferation phase, according to Strosse *et al.*¹¹. Shoots of 3-4 cm in height, with 2-3 formed leaves were separated and transferred to Murashige and Skoog (MS) medium without growth regulators. The growth conditions were: 1000 to 5000 lux, 25 ± 1°C, and a 16 hours light-8 hours dark photoperiod. After 30 days, plants 7 cm in height were subjected to acclimatization in greenhouse conditions.

¹ Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Yucatán, México.

² Unidad de Recursos Naturales, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Yucatán, México.

³ Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

Seedlings were removed from containers, roots were cut, and seedlings were planted in trays containing a moist mixture of soil: peat (1: 2 v/v). Plants were maintained for 8 days at 80% relative humidity and watered every 8 days with Hoagland solution¹². After 30 days, the plants that reached 15 cm in height and had 5 new leaves were sown in plastic bags with a mixture of soil and peat (2: 1 v/v). After three months, the plants were ready for infection.

Conidiation

Conidia were produced according to Acosta-Suárez *et al.*¹³. *P. fijiensis* strain C1233 was cultivated in 10 Petri dishes with potato dextrose agar (PDA) medium for 14 days and then transferred to 10 flasks, each with 50 ml of liquid potato dextrose broth (PDB) for an additional 14 days to obtain sufficient biomass. Mycelium was harvested, finely macerated in aseptic conditions and inoculated on PDA agar slants. Cultures were incubated in constant white light at 20°C for 18 days until a fine grayish layer was observed. The presence of conidia was confirmed by microscopic observation.

Infection and sampling

Conidia were harvested and quantified using a Neubauer chamber. The concentration was adjusted to 10⁵ conidia ml⁻¹ with 1% gelatin for plant infection. The banana plants were inoculated on the abaxial surface of the 2nd and 3rd leaves with the conidial solution. For control plants, the leaves were inoculated with a 1% gelatin solution. Sample collection was carried out on days 0, 3, 6, and 9 post-inoculation (3 plants per data point). Samples were packaged, labeled, and frozen in liquid nitrogen until extraction.

Total RNA extraction and transcriptome sequencing

RNA was extracted independently from each sample (0.5 g) using Concert™ Plant RNA reagent (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. For transcriptomics analysis, a pool of all data points (5 µg of RNA from each point) was prepared, *i.e.*, each pool contained the biological replicates corresponding to samples 0, 3, 6, and 9 d post-infection. In total, there were 6 pools: 3 for control samples and 3 for treatment.

Samples were sequenced at IBT facility (UNAM, Mexico) on the Illumina NextSeq platform with paired-end sequencing for 2×75 cycles.

Data analysis

The raw transcriptome data quality assessment was done using FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) and fast trimmer to retain reads at least 75 bp long with a minimum Phred quality score of 30. Clean reads

were obtained by removing the empty reads, adaptor sequences, and the low-quality sequences (reads with unknown base pairs "N"). Once verified, the reads were mapped against the reference genome of *P. fijiensis* strain CIRAD86, and the annotation data for *P. fijiensis* genes was downloaded from JGI genome portal of *P. fijiensis* (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mycfi2/Mycfi2.home.html>). To map the reads obtained from *Musa acuminata*, we used the genome reported in Banana Genome Hub (<https://banana-genome-hub.southgreen.fr/>). Alignment of RNA Seq data (in BAM format) was done using SMALT. An in-house python script was used to make in tandem modifications to the data. Each sequencing library had at least 10 million reads per sample.

To identify the *P. fijiensis* genes with the highest expression during biotrophy, we normalized the quantification of the data, *i.e.*, the mean gene expression of each sample was expressed as reads per kilobase per million reads sequenced (RPKM). Using the formula "RPKM = (read count * 10⁹) / (read length * total read count)", the genes with the highest value of RPKM were selected. Protein identifications and functional predictions were obtained by searching for sequence homologs using BlastP (E-Value 1.0E⁻¹⁰) at GenBank; if an uncharacterized protein represented the most significant match in BlastP, the first match in the list of homologous proteins where a protein function was available was considered. The taxonomic distribution of homologs was established from BlastP results. Homology with pathogenesis-related genes was determined by BLASTing in the Pathogen-Host Interaction (PHI) database (<http://phi-blast.phi-base.org/>).

The computation of theoretical molecular weight (Mw), amino acid composition, and cysteine content were performed using the Expasy Compute tool (<https://web.expasy.org/>). The presence of a signal peptide was predicted using SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/index.php>). Information about the subcellular protein localization was obtained using Wolfpsort (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) and LOCALIZER¹⁴. Effector prediction was conducted with EffectorP 2.0 (<http://effectorp.csiro.au/>). Domains were searched in the InterProcan database (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>), and motifs using MEME suite (<http://meme-suite.org/tools/meme>).

Results and Discussion

Three libraries, each containing more than 10 million reads, were obtained. In the infected samples, 82–86% of sequences mapped to *M. acuminata* while 3.8–7.8 % mapped to *P. fijiensis* (Table 1).

Samples	<i>Pseudocercospora fijiensis</i>		<i>Musa acuminata</i>	
	Reads	Percentage	Reads	Percentage
EC1	----	---	19,450,158	(86.3824%)
EC2	---	---	19,500,460	(87.5127%)
EC3	---	---	17,718,856	(87.1023%)
EI1	15,880	(3.87003%)	29,317,438	(82.6536%)
EI2	27,382	(6.20229%)	25,820,534	(83.2654%)
EI3	26,882	(7.86166%)	18,835,844	(86.2246%)

EC, Dwarf Cavendish control; EI, infected Dwarf Cavendish. ----, absent.

Table 1. Number and percentage of sequences mapped with the genome of *Musa acuminata* and *Pseudocercospora fijiensis*.

In total, 7144 genes of *P. fijiensis* were identified. Paying attention to those genes with the highest expression, we found 40 genes with RPKM>200, and among these, nine with RPKM >1000 and two with RPKM >3000 (Figure 1). Table 2 lists, in descending order, the 15 genes with the highest expression identified during *P. fijiensis* biotrophy, while Table 3 corresponds to the *in silico* characterization of these genes.

The first two genes with the highest expression were codified for small proteins with unknown function (Tables 2 and 3). Searching in the PHI database, both genes had a single hit respectively: *P. fijiensis* protein 181247 matched with the *trpA* gene of *Aspergillus fumigatus* and the protein 212585 with PKS1 of *Alternaria alternata*. However, both queries match the subjects on short fragments; protein 181247 shares 45% identity in 30 of the 517 amino acids of the *trpA* protein, while protein 212585 shares 27% identity in 55 of the 1484 amino acids of the PKS1 protein. These genes are also expressed during the necrotrophic phase of *P. fijiensis* infection, but with much lower expression than found here during biotrophy, especially protein 212585 (Table S1 in Noar and Daub¹⁰). Therefore, although their functions are mostly unknown, it is possible to hypothesize that these proteins play essential roles in the pathogenesis process of *P. fijiensis*, principally during the biotrophic stage. The short fragments of the queries matching the subjects were not enough to retrieve these genes when BLASTed against the GenBank database. BlastP only retrieved one subject in each case, uncharacterized proteins of *P. fijiensis* CIRAD86. These upregulated genes are, therefore, specific to this pathogen.

The third-highest expressed gene of *P. fijiensis* in the transcriptome corresponded to a Dol-P-mannosyltransferase. Recently, Pham *et al.*¹⁵ studied the biosynthetic machinery of the cell wall of the obligate biotrophic *Blumeria graminis f. sp. hordei*, and found that one of the most highly expressed enzymes was a Dol-P-mannosyltransferase. This economically important pathogen of barley has large amounts of mannosyl residues in its cell wall compared to other fungi; so, the high expression of enzymes involved in the synthesis of N-glycans

in *B. graminis f. sp. hordei* is congruent. The high expression of the Dol-P-mannosyltransferase in *P. fijiensis* suggests that mannosyl residues play an essential role in the biotrophic stage of this fungus. During this stage, *P. fijiensis* needs to remain undetected by the host to complete the infection process. Part of the fungus' survival strategy is to maintain its cell wall, preventing the detection of cell wall fragments by host receptors that trigger plant defense responses that are detrimental to the pathogen.

Protein families related to oxidoreduction are involved in pathogenesis, secondary metabolite biosynthesis, and toxins or drugs' detoxification. Tyrosinases are enzymes with oxidoreductase activity and are also virulence factors of necrotrophic fungi^{16,17}. One of the most highly expressed proteins found in our analysis was a tyrosinase. Similarly, a tyrosinase was an enriched term in the transcriptome of the biotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa* during *Theobroma cacao*¹⁸, and during the biotrophic phase of tomato and potato infection by *Phytophthora infestans*¹⁹. The other highly expressed redox protein found in the *P. fijiensis* transcriptome was a NADPH-binding short-chain dehydrogenase (ID 89955). It appears that short-chain dehydrogenases are under different temporal regulation in *P. fijiensis* since during *P. fijiensis* necrotrophy, 11 upregulated short-chain dehydrogenases were found, most likely involved in secondary metabolism¹⁰.

Similarly, a short-chain dehydrogenase was upregulated specifically during the biotrophic phase of *Colletotrichum graminicola*²⁰, which supports this enzyme's finding in *P. fijiensis* biotrophy. However, the role of tyrosinases and short-chain dehydrogenases during the fungal biotrophy stage remains to be determined. Other identified proteins involved in redox activity were a blue copper domain-containing protein (ID 210602) and a cytochrome b561 domain-containing protein (ID 89281), demonstrating the importance of electron transport and redox homeostasis in the *P. fijiensis* biotrophic stage.

One of the upregulated genes codifies a glyoxalase 3 enzyme (GLY3), which catalyzes methylglyoxal (MG) conversion to D-lactate in a glutathione-independent reaction. MG is pro-

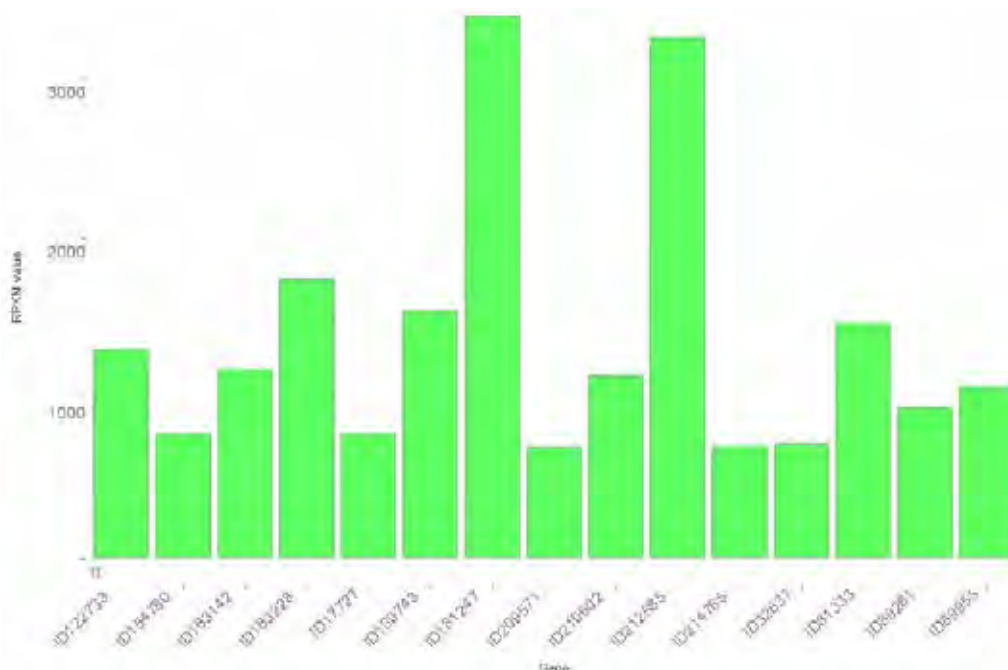


Figure 1. Top 15 genes upregulated during the biotrophic stage of *Pseudocercospora fijiensis* infection of *Musa acuminata* cv Dwarf Cavendish.

ID (JGI <i>P. fijiensis</i> portal)	RPKM	KOG Class*	InterPro Description*	BlastP description
181247	3388.608749	No description	No description	Uncharacterized protein MYCFIDRAFT_181247 [Pseudocercospora fijiensis CIRAD86]
212585	3259.206789	No description	No description	Uncharacterized protein MYCFIDRAFT_212585 [Pseudocercospora fijiensis CIRAD86]
163228	1744.092399	No description	No description	Dol-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-Dol alpha-1,3-mannosyltransferase
180743	1548.401933	No description	No description	Uncharacterized protein MYCFIDRAFT_180743 [Pseudocercospora fijiensis CIRAD86]
81333	1469.158554	Signal transduction mechanisms,	Serine/threonine protein kinase	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase I
122733	1306.218113	No description	No description	Myb DNA-binding domain protein
163142	1182.566165	Oxidoreductase activity	Tyrosinase	Tyrosinase-like protein orsC, Di-copper center-containing protein
210602	1140.979172	Copper ion binding, transcriptional repressor activity, regulation of nitrogen utilization	Blue (type 1) copper domain	Uncharacterized protein MYCFIDRAFT_210602 [Pseudocercospora fijiensis CIRAD86]
89955	1072.194216	Bifunctional catalytic function	NAD(P)-binding	Putative short-chain dehydrogenase reductase protein, NAD(P)-binding protein
89281	941.3445704	Energy production and conversion	Cytochrome b	Cytochrome b561, FMN-linked oxidoreductase
154780	781.1835463	Nucleic acid-binding, RNA processing, and modification	Polynucleotidyl transferase, Ribonuclease H fold, Ribonuclease CAF1	Ribonuclease H-like protein
177270	777.7001645	No description	No description	Uncharacterized protein MYCFIDRAFT_177270 [Pseudocercospora fijiensis CIRAD86]
32637	715.8592589	Hydrolase activity, carbohydrate metabolism	Glycoside hydrolase/deacetylase, beta/alpha-barrel	Polysaccharide deacetylase family protein,
214765	695.8947399	No description	No description	Glutathione-independent glyoxalase 3, ThiJ/DJ1/PfpI family protein
209571	691.7767145	Lipid transport and metabolism	Lipase, active site; Lysophospholipase	Uncharacterized protein MYCFIDRAFT_209571 [Pseudocercospora fijiensis CIRAD86]

*Downloaded from *P. fijiensis* genome portal

Table 2. *Pseudocercospora fijiensis* genes with the highest expression values during biotrophy phase infection of banana cv. Dwarf Cavendish.

duced during various abiotic stress conditions such as salinity, drought, flooding, cold, heat, etc., as well as during biotic stresses. The plants possess multiple DJ-1/PfpI GLY3 to detoxify MG, e.g., *Zea mays* have eleven GLY3, *Sorghum bicolor* has five *Musa acuminata* has four²¹. In fungi, the first reports of identification of GLY3 were in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*, where GLY3 was associated with stress tolerance²². To the best of our knowledge, the present work is the first report of DJ-1/PfpI GLY3 in fungal biotrophy, and it suggests that the detoxification of MG is one important adaptive strategy of *P. fijiensis* to colonize banana.

For all pathogens, efficient nutrition is a prerequisite for successful establishment. Among the upregulated genes during biotrophy, there were genes involved in the uptake of purines from the host environment (ID 64453), lipid transport (ID 209571), and carbohydrate hydrolysis (ID 32637). Usually, purine uptake is low in the fungal biotrophic stage, fueled by *de novo* biosynthesis^{23,24}. In another *P. fijiensis* study, adenylosuccinate synthetase (AdSS) and orotidine 5'-phosphate decarboxylase (OMP decarboxylase), key enzymes involved in *de novo* biosynthesis of purines and pyrimidines, respectively, were identified in the cell wall proteomes of the highly

ID (JGI <i>P. fijiensis</i> portal)	SignalP	Size (amino acids)	Cell localization	Homologs in PHI (% identity)
181247	No	70	Extracellular	45% in a small fragment (31 aa) of <i>Aspergillus fumigatus</i> ttpA
212585	No	88	Nucleus	27% in a small fragment (55 aa) of <i>Alternaria alternata</i> Pks1
163228	Yes	289	Extracellular	45% in a small fragment (40 aa) of <i>Streptococcus pneumoniae</i> CRH
180743	Yes	115	Chloroplast	No hits found
81333	No	230	Chloroplast	No hits found
122733	No	142	Nucleus	40% in a small fragment (75 aa) of <i>Fusarium graminearum</i> GzMyb007
163142	No	340	Extracellular	27% in a fragment (317 aa) of <i>Fusarium graminearum</i> FGSG_04510
210602	No	295	Extracellular	30% in a small fragment (170 aa) of <i>Magnaporthe oryzae</i> NMR3
89955	Yes	204	Extracellular	37% in a small fragment (49 aa) of <i>Magnaporthe oryzae</i> MoSCAD1 (MGG_05096)
89281	Yes	239	Extracellular	No hits found
154780	No	504	Chloroplast	37% in a small fragment (49 aa) of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pvdA
177270	No	214	Nucleus	27% in a small fragment (85 aa) of <i>Zymoseptoria tritici</i> ZtGT2
32637	No	314	Extracellular	38% on 302 aa of <i>Fusarium graminearum</i> fgm2 (FGSG_10992)
214765	No	256	Extracellular	30% on 229 aa of <i>Candida albicans</i> GLX3
209571	No	320	Extracellular	27% on 115 aa of <i>Salmonella enterica</i> STM14_RS07755

Table 3. *In silico* characterization of the *P. fijiensis* genes with the highest expression observed during biotrophy phase infection of banana cv. Dwarf Cavendish.

virulent *Oz2b* strain, signaling that these *de novo* biosynthetic pathways are important for virulence of this pathogen²⁵. Here, another highly expressed enzyme during biotrophy was a putative purine permease, revealing that both routes are functional in *P. fijiensis*. Other fungi are also versatile and can take up nucleosides from the host and utilize nucleosides through their salvage metabolism or *de novo* pathways²⁶.

Interestingly, one of the top-expressed genes in *P. fijiensis* is a predicted ribonuclease H-like protein. The phylogenetically-related fungus, *Zymoseptoria tritici*, secretes the ribonuclease effector Zt6 during wheat infection. The characterization of Zt6 revealed toxicity against bacteria, yeasts, filamentous fungi, and phytotoxicity on tobacco and wheat²⁷. Ribonuclease H-like proteins comprise a superfamily in the obligate biotroph, *Blumeria graminis*, in which they are termed RALPHs; it is the most extensive set of secreted effectors in this pathogen. Pennington *et al.*²⁸ demonstrated that the RALPH effector protein CSEP0064/BEC1054 interferes with the degradation of host ribosomal RNA and represses plant immunity. Since the ribonuclease H-like protein (ID 154780) is upregulated during the biotrophic stage in *P. fijiensis*, it is tempting to speculate that it plays a similar role in the black Sigatoka disease as the *B. graminis* CSEP0064/BEC1054 effector in powdery mildew disease on cereals and grasses. However, its role in antimicrobial competition and niche protection cannot be ruled out.

When BLASTing in the PHI database, most of the genes retrieved hits, but poor coverage and identity with their respective hits were observed except genes 163142 and 32637. Three genes have no hits at all (Table 3). Low conservation in pathogenicity-related proteins, especially effector proteins, is quite common.

Effectors play fundamental roles in pathogenesis, playing

diverse roles in camouflaging the pathogen, protecting the pathogen from host defense mechanisms, suppressing said host defenses, or attacking host cells. Effector identification can be difficult; in most cases, effectors do not share homology with other known proteins. Furthermore, not all effectors present with the same characteristics, although a few have been established to identify identification better. Canonical effectors are predicted based on the small size (<400 amino acids), richness in cysteine (>4 Cys or >2% per sequence), the occurrence of a signal peptide, and absence of a transmembrane domain⁹. Other criteria to identify *in silico* effectors include: high *in planta* expression, pathogenesis-related domains, and discontinuous taxonomic distribution²⁹. Besides, many effectors have unknown functions, with no homologs in other fungi, or are homologous only to closely-related organisms. To explore whether hypothetical proteins of *P. fijiensis* with unknown functions are probable effectors, they were further analyzed *in silico*. Table 4 presents the possible effector candidates found in the *P. fijiensis* early infection transcriptome. The two proteins found to be related to fungal effectors were included in this list.

Restricted phylogenetic distribution in these genes (Table 4) is consistent with what is expected for effectors³⁰. The ribonuclease H-like protein and the Myb DNA-binding domain TF have discontinuous taxonomic distribution; meanwhile, the other four genes are exclusive to *P. fijiensis*, *i.e.*, no hits in other fungi. None of the six effector candidates meet canonical characteristics; thus, these genes are probably non-canonical effectors. The protein 212585 matches the Mig-14 Pfam domain, which is present in bacterial proteins and contributes to bacterial resistance to antimicrobial peptides³¹. This effector could enable *P. fijiensis* to cope with host antimicrobials or to

ID protein (JGI <i>P. fijiensis</i> portal)	Predicted function	Size	Cys	%Cys	TMD	Signal P	Domain	Motif	Taxonomic distribution	EffectorP 2.0
181247	Uncharacterized protein	70	2	2.86	No	No	No Pfam matches	No	No hits in other fungi	0.527
212585	Uncharacterized protein	88	3	3.4	No	No	Mig-14	No	No hits in other fungi	0.663
180743	Uncharacterized protein	115	2	1.74	2	Yes	The domain of the unknown function (DUF2715)	No	No hits in other fungi	0.715
122733	Myb DNA-binding domain protein	142	1	0.70	No	No	Myb/SANT-like DNA-binding domain, PP-loop (ATP binding 3) family	No	<i>P. musae</i> , <i>P. fuligena</i> , <i>P. eumusae</i> , <i>Dothistroma septosporum</i> , <i>Cercospora</i> spp., <i>Hortaea werneckii</i> , <i>Friedmanniomyces endolithicus</i> , <i>Elsinoe</i> spp., <i>Aureobasidium pullulans</i>	0.759
154780	Ribonuclease H-like protein	504	3	0.6	No	No	CAF1	G[IFY][ALST]R motif	<i>P. eumusae</i> , <i>P. musae</i> , <i>P. fuligena</i> , <i>Dothistroma septosporum</i> , <i>Zyoseptoria tritici</i> , <i>Friedmanniomyces endolithicus</i> , <i>Cercospora</i> spp., <i>Ramularia collo-cygni</i> , <i>Zyoseptoria tritici</i> , <i>Hortaea werneckii</i>	0.889
177270	Uncharacterized protein	214	3	1.40	No	No	No Pfam matches	No	No hits in other fungi	0.787

Table 4. *P. fijiensis* effector candidates with full expression during biotrophy on banana cv. Dwarf Cavendish.

compete inside the host against microbial endophytes to conquer the niche.

Like the proteins mentioned above, the proteins with IDs 181247 and 177270 are unique to *P. fijiensis*, but have no identifiable domains. Many effectors have shown to be unique to their pathogens as they evolve in specific interactions with the host.

In the motif analysis, only the protein corresponding to ID 154780 contained a motif: the G[IFY][ALST]R motif (p-value of $4.35e^{-05}$), which has been found in secreted pathogenicity-related proteins expressed in the haustoria of the biotroph Flax rust and effector proteins secreted by *Puccinia triticina*³²⁻³⁴, another biotrophic fungus. Therefore, this motif in protein 154780 is consistent with its role in the biotrophic stage.

Modulation of gene expression requires the participation of transcription factors (TFs). The protein 122733 contains a Myb DNA-binding domain, which is a large and ubiquitous family of TFs. In *Fusarium graminearum*, the mutation of the nuclear protein MYT3, a Myb-Like TF reduced pathogenicity³⁵. Another putative TF was identified among the top 40 genes with the highest expression. This protein (ID 213137) is a nucleic acid-binding protein, a putative zinc finger C2H2-type TF. Zinc-finger proteins (ZNFs) are ubiquitous proteins able to interact with DNA, RNA, and other proteins. ZNFs are involved in some processes such as transcriptional regulation, ubiquitin-mediated protein degradation, signal transduction, DNA repair, and cell migration. In the fungus, *Ustilago maydis*, the transcription factor Mzr1, a Cys2His2-type zinc finger, regulates fungal gene expression during the biotrophic growth stage³⁶. Bioinformatic characterization of the protein 213137 predicts nuclear localization, which supports that protein 213137 plays a similar role in *P. fijiensis* as does Mzr1 in *U. maydis*.

Conclusions

This is the first report that focuses on the identification and *in silico* characterization of genes involved in the biotrophic stage of infection of *P. fijiensis*, the causative agent of the black Sigatoka disease of banana. Our transcriptomic analysis successfully uncovered *P. fijiensis* proteins involved in repressing host defense immunity and coping with environmental conditions inside the host. Six of the upregulated genes are effector

candidates, three of them with novel, unknown functions.

Acknowledgments

This work was supported by the National Council of Science and Technology (CONACYT) project FOSEC-SEP 220957, Mexico. Fellowship from CONACYT- 589301 for K. G. Carreón-Anguiano, CONACYT-291236 for J. N. A. Todd, CONACYT-702045 for R. Gómez Tah and the support by BioAli-CYTED are acknowledged. Authors thank CIBBE-ESPOL (Ecuador) by financial support for this Open Access publishing.

Bibliographic references

- Atakonya AE, Kimunyeb J, Mahukuc G, Amaha D, Uwimanab B, Brownd A, et al. Progress in understanding *Pseudocercospora* banana pathogens and the development of resistant *Musa* germplasm. *Plant Pathol.* 2018;67:759–770.
- Churchill ACL. *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control: *M. fijiensis*, BLS pathogen of banana. *Mol Plant Pathol.* 2011;12(4):307–28.
- Chang TC, Salvucci A, Crous PW, Stergiopoulos I. Comparative Genomics of the Sigatoka Disease Complex on Banana Suggests a Link between Parallel Evolutionary Changes in *Pseudocercospora fijiensis* and *Pseudocercospora eumusae* and Increased Virulence on the Banana Host. *PLoS Genet.* 2016; 12(8): e1005904.
- Álvarez JC, Rodríguez HA, Rodríguez-Arango E, Monsalve ZI, Morales O. JG, Arango I RE. Characterization of a differentially expressed phenylalanine ammonia-lyase gene from banana induced during *Mycosphaerella fijiensis* infection. *J Plant Stud.* 2013;2(2):35.
- Rodríguez HA, Rodríguez-Arango E, Morales JG, Kema G, Arango RE. Defense gene expression associated with biotrophic phase of *Mycosphaerella fijiensis* M. morelet infection in banana. *Plant Dis.* 2016;100(6):1170–5.
- Lepoivre P, Busogoro JP, Etame JJ, El Hadrami A, Carlier J, Harelimana G, et al. *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook [Internet]. *Bioversityinternational.org*. [cited 2020 15 June]. Available from: <https://www.bioversityinternational.org/e-library/publications/detail/mycosphaerella-leaf-spot-diseases-of-bananas-present-status-and-outlook/>

7. Cho Y, Hou S, Zhong S. Analysis of Expressed Sequence Tags from the Fungal Banana Pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. *Open Mycol J.* 2008;2:61-73.
8. Arango-Isaza RE, Diaz-Trujillo C, Dhillon B, Aerts A, Carlier J, Crane CF, et al. Combating a global threat to a clonal crop: Banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis* (synonym *Mycosphaerella fijiensis*) genomes reveal clues for disease control. *PLoS Genet.* 2016;12(8):e1005876.
9. Carreón-Anguiano KG, Islas-Flores I, Vega-Arreguín J, Sáenz-Carbonell L, Canto-Canché B. EffHunter: A tool for prediction of effector protein candidates in fungal proteomic databases. *Biomolecules.* 2020;10(5):712.
10. Noar RD, Daub ME. Transcriptome sequencing of *Mycosphaerella fijiensis* during association with *Musa acuminata* reveals candidate pathogenicity genes. *BMC Genomics.* 2016;17(1):690.
11. Strosse H, Van den Houwe I, Panis B. Banana Cell and Tissue Culture - Review. Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations. Catholic University of Leuven. 2004.1-12.
12. Hoagland DR. The water-culture method for growing plants without soil [Internet]. Rev. ed. / by D.I. Arnon. Berkeley, Calif: College of Agriculture, University of California; 1950. Available from: <https://openlibrary.org/books/OL25240089M.opsd>.
13. Acosta-Suárez M, Alvarado-Capó Y, Cruz-Martín M, Leyva-Mora M, Roque-Morales B. Evaluación en casa de cultivo de la respuesta a la Sigatoka negra de dos cultivares de *Musa* mediante la inoculación artificial de suspensiones conidiales de *Pseudocercospora fijiensis*. *Biotechnol Veg.* 2004;4(2). Available from: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/386/html>.
14. Sperschneider J, Catanzariti A-M, DeBoer K, Petre B, Gardiner DM, Singh KB, et al. LOCALIZER: subcellular localization prediction of both plant and effector proteins in the plant cell. *Sci Rep.* 2017;7(1):44598.
15. Pham TAT, Kyriacou BA, Schwerdt JG, Shirley NJ, Xing X, Bulone V, et al. Composition and biosynthetic machinery of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Cell.* 2019;5(100029):100029.
16. Heard S, Brown NA, Hammond-Kosack K. An Interspecies Comparative Analysis of the Predicted Secretomes of the Necrotrophic Plant Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS One.* 2015;10(6):e0130534.
17. Wang X, Jiang N, Liu J, Liu W, Wang G-L. The role of effectors and host immunity in plant-necrotrophic fungal interactions. *Virulence.* 2014;5(7):722-32.
18. Teixeira PJPL, Thomazella DP de T, Reis O, do Prado PFV, do Rio MCS, Fiorin GL, et al. High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Cell.* 2014;26(11):4245-69.
19. Kagda MS, Martínez-Soto D, Ah-Fong AMV, Judelson HS. Invertases in *Phytophthora infestans* localize to haustoria and are programmed for infection-specific expression. *MBio.* 2020;11(5):e01251-20.
20. Torres MF, Ghaffari N, Buiate EAS, Moore N, Schwartz S, Johnson CD, et al. A *Colletotrichum graminicola* mutant deficient in the establishment of biotrophy reveals early transcriptional events in the maize anthracnose disease interaction. *BMC Genomics.* 2016;17(1):202.
21. Ghosh A, Kushwaha HR, Hasan MR, Pareek A, Sopory SK, Singla-Pareek SL. Presence of unique glyoxalase III proteins in plants indicates the existence of shorter route for methylglyoxal detoxification. *Sci Rep.* 2016;6(1):18358.
22. Wilson MA. Metabolic role for yeast DJ-1 superfamily proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(19):6858-9.
23. Chitty JL, Fraser JA. Purine acquisition and synthesis by human fungal pathogens. *Microorganisms.* 2017;5(2):33.
24. Fernandez J, Yang KT, Cornwell KM, Wright JD, Wilson RA. Growth in rice cells requires de novo purine biosynthesis by the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Sci Rep.* 2013;3(1):2398.
25. Burgos-Canul YY, Canto-Canché B, Berezovski MV, Mironov G, Loyola-Vargas VM, Barba de Rosa AP, et al. The cell wall proteome from two strains of *Pseudocercospora fijiensis* with differences in virulence. *World J Microbiol Biotechnol.* 2019;35(7):105.
26. Daumann M, Golfier P, Knüppel N, Hahn M, Möhlmann T. *Botrytis cinerea* can import and utilize nucleosides in salvage and catabolism and BcENT functions as high affinity nucleoside transporter. *Fungal Biol.* 2016;120(8):904-16.
27. Kettles GJ, Bayon C, Sparks CA, Canning G, Kanyuka K, Rudd JJ. Characterization of an antimicrobial and phytotoxic ribonuclease secreted by the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *New Phytol.* 2018;217(1):320-31.
28. Pennington HG, Jones R, Kwon S, Bonciani G, Thieron H, Chandler T, et al. The fungal ribonuclease-like effector protein CSEP0064/BEC1054 represses plant immunity and interferes with degradation of host ribosomal RNA. *PLoS Pathog.* 2019;15(3):e1007620.
29. Liang P, Liu S, Xu F, Jiang S, Yan J, He Q, et al. Powdery mildews are characterized by contracted carbohydrate metabolism and diverse effectors to adapt to obligate biotrophic lifestyle. *Front Microbiol.* 2018;9:3160.
30. Giraldo MC, Valent B. Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(11):800-14.
31. Brodsky IE, Ernst RK, Miller SI, Falkow S. mig-14 is a *Salmonella* gene that plays a role in bacterial resistance to antimicrobial peptides. *J Bacteriol.* 2002;184(12):3203-13.
32. Catanzariti A-M, Dodds PN, Lawrence GJ, Ayliffe MA, Ellis JG. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell.* 2006;18(1):243-56.
33. Kamel L, Tang N, Malbreil M, San Clemente H, Le Marquer M, Roux C, et al. The comparison of expressed candidate secreted proteins from two arbuscular mycorrhizal fungi unravels common and specific molecular tools to invade different host plants. *Front Plant Sci.* 2017;8:124.
34. Zhang Y, Wei J, Qi Y, Li J, Amin R, Yang W, et al. Predicating the effector proteins secreted by *Puccinia triticina* through transcriptomic analysis and multiple prediction approaches. *Front Microbiol.* 2020;11.
35. Kim Y, Kim H, Son H, Choi GJ, Kim J-C, Lee Y-W. MYT3, a Myb-like transcription factor, affects fungal development and pathogenicity of *Fusarium graminearum*. *PLoS One.* 2014;9(4):e94359.
36. Zheng Y, Kief J, Auffarth K, Farfing JW, Mahlert M, Nieto F, et al. The *Ustilago maydis* Cys2His2-type zinc finger transcription factor Mzr1 regulates fungal gene expression during the biotrophic growth stage. *Mol Microbiol.* 2008;68(6):1450-70.

Received: 23 November 2020

Accepted: 14 January 2021

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Avances en tecnologías de propagación y domesticación de plantas de interés económico y ambiental en Argentina

Advances in technologies for propagation and domestication of plants of economic and environmental interest in Argentina

E. S. Sharry¹, C. Weber², M. Cellini², V. Lien², P. Boeri³, L. Roussy², P. Scoglio², D. Ramilo², S. Galarco² DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.16

Resumen: En el Laboratorio de Estudios de la Madera de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina, se implementa el proyecto de desarrollo tecnológico denominado Métodos y tecnologías de propagación y domesticación de plantas para el desarrollo de una bioeconomía local basada en la biodiversidad. El objetivo del mismo es desarrollar, optimizar y adaptar nuevas metodologías y tecnologías de propagación y conservación de recursos genéticos vegetales para la producción de plantas en nuevo escenario de la bioeconomía nacional. La diversidad está en la base de la bioeconomía, y muchas veces el material vegetal para plantar para diferentes fines es escaso. Las especies contempladas en éste proyecto son: *Quercus sp.*; *Polylepis tarapacana*; *Prosopis alpacato*, *Eranthemum pulchelum* y *Heteropteris angustifolia* Griseb. En este trabajo se comunican algunos de los avances alcanzados aplicando diferentes enfoques para la producción de plantas de calidad (semillas, cultivo de tejidos *in vitro*, macropropagación y plantines en contenedores)

Palabras clave: Bioeconomía, *Quercus*, *Prosopis alpacato*, *Polylepis*, *Eranthemum pulchelum* y *Heteropteris angustifolia*.

Abstract: The Timber Research Laboratory of the Faculty of Agricultural and Forestry Sciences of the National University of La Plata (LIMAD), Argentina, implements the technological development project called Methods and technologies of plant propagation and domestication for the development of a local bioeconomy based on biodiversity. Its objective is to develop, optimize and adapt new methodologies and technologies for the propagation and conservation of plant genetic resources for the production of plants in a new scenario of national bioeconomy. Diversity is at the base of bioeconomy, and often planting plant material for different purposes is scarce. The species covered by this project are: *Quercus sp.* (exotic forest); *Polylepis tarapacana* (native forest); *Prosopis alpacato* (multipurpose native forestry), *Eranthemum pulchelum* and *Heteropteris angustifolia* Griseb (ornamental species of great potential and use in green roofs). This work communicates some of the progress made by applying different approaches to the production of quality plants (seeds, *in vitro* tissue culture, macro propagation and seed container planting)

Key words: Bioeconomy, *Quercus*, *Prosopis alpacato*, *Polylepis*, *Eranthemum pulchelum* and *Heteropteris angustifolia*.

Introducción

El auge actual de uso de especies vegetales nativas y exóticas para usos múltiples y la falta de estudios de sus sistemas de multiplicación, obliga no solo a mejorar los métodos de conservación sino también a mejorar los métodos de propagación sexual y asexual, la calidad del material de siembra o plantación a campo y los métodos de cultivo. La propagación de plantas ha sido ampliamente reconocida como una práctica fundamental en el campo de las ciencias agrícolas ya que de la calidad de la semilla botánica o material vegetativo que se utilice, va a depender el resto del proceso productivo. De algunas especies de interés, falta material de propagación genéticamente mejorado y faltan conocimientos tecnológicos para llevarlo al cultivo y manejarlo a campo en forma eficiente. Es por ello que se deben abordar las diferentes soluciones para ir sentando las bases del conocimiento y desarrollo tecnológico para finalizar con la entrega a la sociedad de productos concretos de material de propagación mejorado y tecnología para su cultivo eficiente. Este tipo de investigación permitiría generar material de propagación genéticamente adecuado y desarrollar la innovación necesaria para introducir al cultivo especies de uso actual o potencial estableciendo las bases tecnológicas para un programa de mejoramiento genético a

largo plazo², la domesticación y la disponibilidad de material para realizar paisajismo, forestación y restauración eco sistémica. En el Laboratorio de Estudios de la Madera (LIMAD) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina, se implementa el proyecto de desarrollo tecnológico denominado Métodos y tecnologías de propagación y domesticación de plantas para el desarrollo de una bioeconomía local basada en la biodiversidad. El objetivo del mismo es desarrollar, optimizar y adaptar nuevas metodologías y tecnologías de propagación y conservación de recursos genéticos vegetales para la producción de plantas en nuevo escenario de la bioeconomía nacional. La diversidad está en la base de la bioeconomía, y muchas veces el material vegetal para plantar para diferentes fines es escaso. Las especies contempladas en éste proyecto son: *Quercus sp.* (forestal exótica); *Polylepis tarapacana*; *Prosopis alpacato*, *Eranthemum pulchelum* y *Heteropteris angustifolia* Griseb. La selección de las especies se realizó en primer lugar en base a su uso actual o potencial, definida como las potencialidades de la especie para una buena adaptación a crecer y desarrollarse en condiciones de cultivo, razonable velocidad de crecimiento, adecuada calidad para asegurar un producto diferenciado y

¹ Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina. Unidad Integrada para la Innovación del Sistema Agroalimentario de la Patagonia Norte, UIISA; Centro de Investigación y Transferencia de Río Negro, CIT-RN-CONICET, Universidad Nacional de Río Negro, Río Negro, Argentina.

² Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

³ Unidad Integrada para la Innovación del Sistema Agroalimentario de la Patagonia Norte, UIISA; Centro de Investigación y Transferencia de Río Negro, CIT-RN-CONICET, Universidad Nacional de Río Negro, Río Negro, Argentina.

un reconocimiento actual de la misma sobre posibilidades del mercado que allane el camino futuro de su comercialización. Adicionalmente, se tuvo en cuenta la erosión genética sufrida por las diferentes especies (estrechamente relacionada con la demanda actual o pasada) y la necesidad urgente de definir e instalar unidades de conservación para mantener la población base del programa de domesticación y mejora a largo plazo. La producción masiva de plantas mediante la combinación de sistemas de propagación tradicionales, macro y micropropagación (biotecnologías), los ensayos de aclimatación de las plantas y el establecimiento a campo, permitiría producir fácilmente plantas en periodos de tiempo corto. En este trabajo se comunican algunos de los avances alcanzados.

Las especies

Polylepis tarapacana es un árbol de hábito simpódico, presentando un tronco corto y pudiendo alcanzar tres metros de altura³. Es tolerante a las heladas, minimizando el daño tisular por su capacidad de sobreenfriamiento y reducir la pérdida de agua por control estomático^{4,5}. Las hojas son perennes⁶, y la floración se produce en un amplio período de tiempo, mientras que la maduración de frutos ocurre entre los meses de abril y junio⁷. Los bosques de *P. tarapacana* se encuentran en la provincia fitogeográfica Altoandina de la Argentina, presentando un clima frío y seco con precipitaciones en forma de nieve o de granizo en cualquier época del año^{8,9}. El objetivo de esta parte de la investigación fue determinar la producción, biometría y viabilidad de flores y semillas en árboles y arbustos de *P. tarapacana*, como primer paso para caracterizar su biología reproductiva en vistas a su conservación y propagación.

Prosopis alpataco es una especie arbórea de Sudamérica, de la familia de las leguminosas, que habita el centro oeste de Argentina, la ecorregión de Gran Chaco y zonas semiáridas del Noroeste Argentino, Cuyo y la Patagonia argentina. Es una especie clave del Monte, una de las ecorregiones sudamericanas más amenazadas. En esta región, varios factores limitan la producción de las plantas nativas, entre ellas el desconocimiento de su sistema de reproducción, el ajuste de técnicas de propagación sexual y asexual y el comportamiento a campo de estas plantas propagadas. *P. alpataco* se propaga naturalmente por semillas, y se ha logrado ajustar la embriogénesis somática¹⁰; sin embargo, no hay reportes previos de la propagación *in vitro* por organogénesis. El objetivo de esta parte de la investigación fue micro propagar vía organogénesis, explantes de alpataco con el objeto de multiplicar masivamente esta planta.

Eranthemum pulchellum A. es una especie de la familia Acanthaceae, de origen asiático e introducida en Argentina con fines paisajísticos. Es un arbusto perenne y de muy amplia ramificación. Posee una extraordinaria floración color azul franca en pleno invierno y sus hojas color verde brillante le otorgan un gran atractivo visual. Es una planta que puede alcanzar 1,6-1-8 m de altura y un diámetro de mata de 1,2-1,5 m. (su rápido crecimiento le permite alcanzar el tamaño definitivo en una sola temporada). Se adapta a situaciones de bajas temperaturas, aunque no soporta heladas ni temperaturas cercanas a cero grados o bajo cero. Bajo estas situaciones no muere la planta, pero sí tiene una defoliación importante; luego rebrota en primavera bajo temperaturas cálidas. En estos casos se pierde su floración de fines de invierno. Las excepcionales flores de color azul profundo son pequeñas, están compuestas de cinco pétalos y dos largos filamentos, que se producen en espigas terminales y erectas y que se alzan por encima del conjunto de la mata.

Heteropteris angustifolia es una especie de la familia Malpighiaceae, nativa endémica de Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay. Es un arbusto caduco, que puede alcanzar los 2,5 m de altura. Posee una floración amarilla que convive con su fruto sámara color rojo en primavera, verano y parte del otoño. Produce un diámetro de mata de 1-1,5 m. y se adapta fácilmente a situaciones de sequedad temporal. Es una planta heliófila, aunque puede sobrevivir bajo dosel arbóreo. Soporta heladas y bajas temperaturas sin inconvenientes. Posee flores amarillas en una inflorescencia terminal, en racimos terminales o axilares y fruto sámaras rojizas de 2-2,5 cm de largo. *Eranthemum pulchellum* A y *Heteropteris angustifolia* tienen uso ornamental. El objetivo de esta parte de la investigación fue avanzar en la etapa I de conformación de las plantas madre en invernadero para su posterior propagación. De manera simultánea, se probaron plantaciones *in situ* de plantas obtenidas a partir de esquejes.

Quercus robur L (roble europeo) es una especie originaria de Europa occidental, se distribuye desde el Océano Atlántico al este hasta los montes Urales y el Mar Caspio al Oeste, y desde Escocia y el sur de Escandinavia hasta España, norte de África y Turquía^{11,12} con una distribución altamente influenciada por la actividad humana¹³ que se adapta a distintas zonas de nuestro país, entre ellas la región de la pampa ondulada. Esta especie reviste interés forestal para su uso como madera entre otros. El objetivo de esta parte de la investigación fue contribuir al conocimiento de la supervivencia y crecimiento inicial de forestaciones con roble europeo en macizos en la zona de La Plata, Argentina. Específicamente se propuso estudiar la supervivencia y el crecimiento inicial aéreo de las plantas en un sistema de macizo.

Materiales y métodos

Polylepis tarapacana

Se analizaron 17 de un total de 96 árboles (individuos con una altura mayor a 1,3 m) y arbustos (individuos con una altura menor a 1,3 m) de *P. tarapacana*. Las muestras fueron colectadas en las localidades de Casa Colorada, Liviara, Mina Pirquitas, Susques y Coyahuaima en la provincia de Jujuy, con una altitud entre 4375 y 4620 m s. n. m. A estos 17 individuos se les midió la altura (H - cm) y el diámetro en la base (DAB - cm) con cinta diamétrica. Se utilizó el método de relación del diámetro¹⁴ para la estimación de la producción de flores y semillas, contando el número de flores y semillas en dos ramas de un individuo y extrapolando al resto de las ramas del árbol. En laboratorio se identificaron como flores aquellas que aún conservaban los estambres y fruto cuando no se observaron, observándose claramente un mayor desarrollo del fruto (Figura 1). La producción de semillas se calculó para árboles y arbustos ya que se observaron diferencias en la producción de semillas debido al porte forestal en *Polylepis tomentella* Wedd., *Rosaceae* (especie de características similares y que habita en el rango altitudinal inmediato inferior a *P. tarapacana*)¹⁵, encontrando una relación positiva entre el tamaño de las ramas de los árboles y la producción de flores y frutos. Se aplicó un ANOVA de una vía entre la producción de flores y frutos tomando como factores a los árboles y arbustos. A su vez se realizó un análisis de regresión lineal en árboles (Ar) y arbustos (a), relacionando el diámetro en la base (DAB) y la altura (H - cm) con la producción de flores y frutos.



Figura 1. Izquierda: flor de *Polylepis tarapacana* con estambres. Derecha: fruto *Polylepis tarapacana*.

Prosopis alpataco

Se utilizaron segmentos nodales intercalares y apicales como explantes. Los mismos fueron cultivados en envases de vidrio conteniendo el medio de cultivo Murashige-Skoog (MS)¹⁶ completo sin reguladores de crecimiento (control) o suplementado con diferentes concentraciones de ácido naftaleno-cético (ANA: 1; 1,5 y 3 mg/l). Los frascos fueron mantenidos en cuarto de cultivo, a 25 ± 2 °C y con ciclo de luz / oscuridad de 16 / 8 horas de luz. Se cultivaron 15 secciones nodales por tratamiento y se realizaron tres repeticiones. A los 30 días de cultivo *in vitro* se evaluó el porcentaje de enraizamiento, longitud de raíces, formación y número de callos y número de brotes. La formación de nuevos brotes fue evaluada con la cuantificación del número de explantes que produjeron brote y el número de brotes presentes por explante. Mediante un seguimiento histológico, se determinó el lugar de inicio de formación de brotes y las características anatómicas de los folíolos formados *in vitro*.

Eranthemum pulchellum A

La formación de plantas madre se realizó sobre cajones de 0,5 m por 0,6 m de lado y 0,3 m de profundidad, con sustrato formado con 15% de perlita, 15% de arena y 70% de compost orgánico. La multiplicación fue mediante estacas de 15 cm de largo, sin hojas o con brotes axilares, que fueron colocadas de manera vertical manteniendo la polaridad respectiva y enterradas 7 cm en el sustrato. La plantación se realizó en la primavera del año 2019 una vez culminada la floración de invierno. Se realizó un riego regular para mantener el sustrato húmedo. Al cabo de un mes de realizada la plantación, las estacas comenzaron un crecimiento pleno, llegando a conformar la mata para florecer a fines del invierno del año 2019. Se obtuvieron 15 plantas madre, de las cuales se obtiene el material vegetal de estacas de calidad, homogeneidad y cantidad para la realización de los ensayos (Figura 2). De manera paralela, se realizaron plantaciones *in situ* de plantines de *Eranthemum pulchellum A*. (Figuras 3 y 4) en situaciones de techos verdes intensivos en pulmones de edificios que tienen la característica de muy baja disponibilidad lumínica.

Heteropteris angustifolia Griseb

Durante el año 2019 se realizó la cosecha de semillas en plantas previamente identificadas y seleccionadas por caracteres fenotípicos de forma de mata, intensidad de floración y fructificación y crecimiento general. La planta proveedora de



Figura 2. Detalle de flor de planta madre de *Eranthemum pulchellum*. Invernadero de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. Octubre 2020.

semillas se encuentra ubicada en el Jardín de la Memoria de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, La Plata, Argentina. Se utilizaron las semillas sin tratamiento previo y fueron sembradas en almácigos en los meses de agosto y septiembre. Al cabo de dos meses se trasplantaron a su lugar definitivo en tierra mejorada para la provisión de semillas de calidad. La plantación de plantas madre se realizó sobre tierra mejorada en un 15% con perlita y un 15% con arena, buen drenaje y riego y desmalezado durante el primer año. La plantación se realizó en el verano del año 2019.



Figura 3 y 4. Plantación *in situ* en techo verde en patio interno Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Año 2018.

Quercus robur L.

Ubicación del ensayo: Estación Experimental Julio Hirschhorn. FCAYF – UNLP. Los Hornos, Pdo. de La Plata.

Descripción de sitio: sitio de loma con antecedentes de cultivo agrícola. Unidad Cartográfica Etch (Etcheverry). 50% Etcheverry (Paleudol típico), 50% Ignacio Correa (Paleudol ácuico). El sitio de emplazamiento corresponde a la serie Etcheverry que es el de mayor calidad de la unidad cartográfica.

Tipo de ensayo: Parcela demostrativa.

Diseño: monobloque. Espaciamiento 4m x 2,5m. Superficie: 0,5 ha.

Preparación del terreno: laboreo en fajas, que incluyó 1 pasada de arado de reja y vertedera, 1 pasada de disco, 1 pasada de camellonadora, 1 pasada de rotoavador y 1 pasada de subsolador en el centro del camellón. Todas las labores realizadas en julio 2019.

Plantación: agosto 2019, utilizando plantas a raíz desnuda (O+1) obtenidas a partir de semilla cosechada de árboles selectos del Parque Provincial Pereyra Iraola (Berazategui, BA).

Al momento de recepción de las plantas del vivero, se observó que una fracción de estas conservaba las hojas secas adheridas al tallo, mientras que las restantes habían perdido totalmente las hojas. La distribución espacial de estas 2 clases de plantas fue al azar en la parcela. Todas las plantas tenían una altura de entre 0,6 y 0,8m y un buen sistema de raíces en cabellera.

Evaluación: medición de Altura total (en cm) con regla a

todas las plantas. Estimación de porcentaje de sobrevivencia (sobrevivencia %) del total de las plantas del ensayo. Registro de plantas afectadas por hormigas y liebres. Se realizaron 3 mediciones durante la primera temporada de crecimiento, en noviembre 2019 y febrero y junio 2020.

Resultados

1. *Polylepis tarapacana*

Se observaron diferencias significativas en la producción de flores ($p = 0,0118$ F: 8,21) y frutos ($p = 0,0052$ F: 10,65) para árboles (Ar) y arbustos (a). Las medias observadas fueron de 83,6 flores en arbustos y 630,8 en árboles; la producción de frutos fue de 189,0 en arbustos y 874,8 en árboles. No encontramos diferencias significativas en la relación entre la producción de flores y la suma de flores y frutos ($p = 0,4004$ F = 0,75) con medias de 0,37 para arbustos y 0,49 para árboles. Los resultados de la regresión lineal entre producción de flores y el tamaño de la base de los individuos (DAB) muestran una tendencia significativa ($R^2: 62,59$) positiva (Producción Flores = $-240,321 + 50,2284 \times \text{DAB}$), al igual que entre producción de frutos y el DAB ($R^2: 43,3685$; Producción de Frutos = $-57,5761 + 48,3744 \times \text{DAB}$) (Figura 5). Lo mismo se observó entre la altura (H) y la producción de flores ($R^2: 76,6305$; Producción

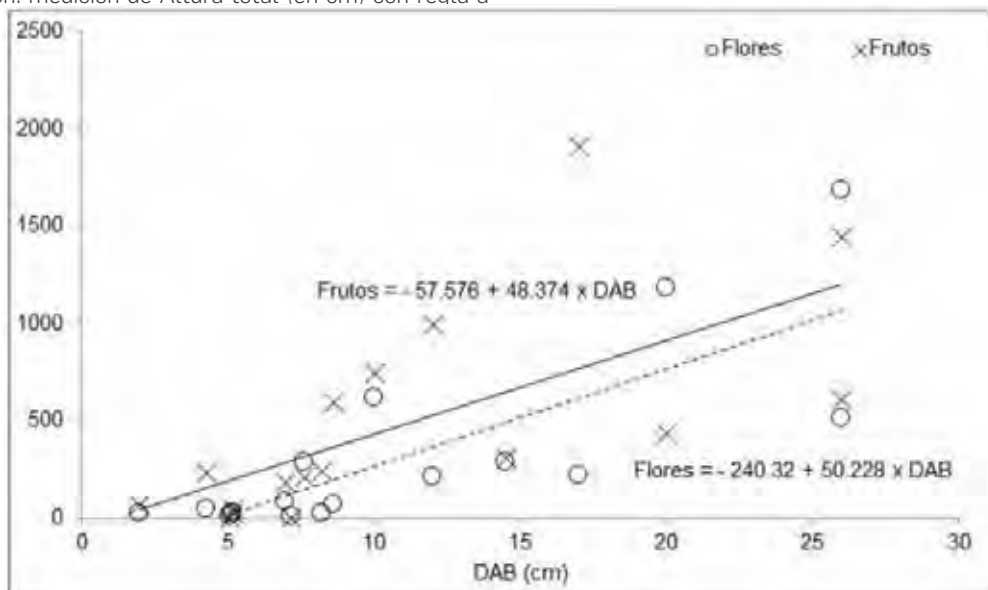


Figura 5. Regresión lineal entre producción de flores y frutos y el diámetro en la base (DAB) en árboles y arbustos de *Polylepis tarapacana*.

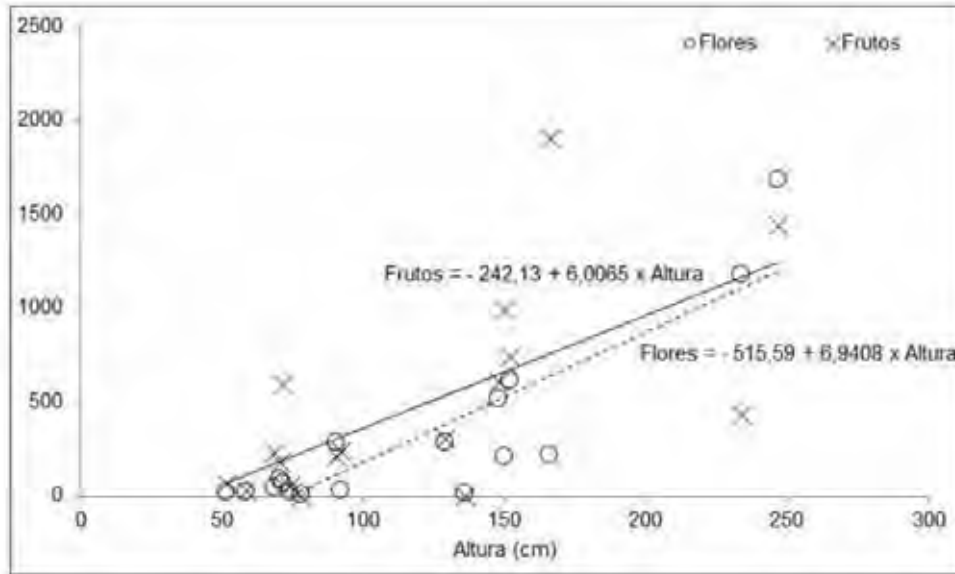


Figura 6. Regresión lineal entre producción de flores y frutos, y la altura (H cm) en árboles y arbustos de *Polylepis tarapacana*.

Flores = $-515,589 + 6,94084 \cdot H$) y frutos ($R^2: 42,8716$; Producción de Frutos = $-242,128 + 6,00652 \cdot H$) (Figura 6).

Estos resultados exploratorios son un indicador de la producción de flores y frutos de la especie. De esta manera podemos inferir la cantidad de semillas a producir en cada estación de reproducción, para estimar la capacidad de regeneración de estos bosques. En una segunda etapa del proyecto, se completará el conteo de flores y frutos y al material colectado se le realizará el análisis de viabilidad, peso y tamaño de semillas para correlacionar estos resultados con los diferentes sitios muestreados. Es necesario aumentar el número de muestras y de observaciones para diseñar nuevos modelos con mejor ajuste estadístico para poder realizar las estimaciones.

2. *Prosopis alpacato*

La Tabla 1 muestra la respuesta morfológica de los explantes cultivados en medios MS con diferentes concentraciones de ANA (0 - 1 - 1,5 - 3 mg/l), después de 30 días de cultivo *in vitro*. El análisis estadístico reveló que no existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los distintos tratamientos realizados.

Como se desprende la Tabla 1, el número de secciones nodales enraizadas fue superior en la mayor concentración evaluada de ANA (3 mg/l). Sin embargo, de la comparación de las longitudes de las raíces obtenidas en cada caso, surgió que las correspondientes a este tratamiento (t3) fueron las que raíces que menor longitud presentaron. El número de secciones nodales que formaron callos fue en aumento, a medida que la concentración de ANA fue mayor. Lo opuesto ocurrió con los brotes obtenidos, donde el mayor número de explantes que produjeron brotes se observó en el tratamiento sin reguladores de crecimiento (control) y el menor (18,75) en ANA 3 mg/l. El tratamiento control produjo un promedio de 6 brotes / explante sin embargo éstos permanecieron sin elongar en el

mismo medio de cultivo (Figura 7).

Se observaron diferencias cualitativas en el tipo de respuesta organogénica, según el explante inicial utilizado. Cuando el material vegetal consistió en secciones nodales apicales, se formaron callos intercalares con brotes, mientras que el cultivo de secciones intercalares favoreció el proceso de enraizamiento a partir de un callo formado en la zona de corte de los explantes. Los callos obtenidos a partir de secciones nodales presentaron capacidad morfológica (obtención de brotes y/o raíces) y, a pesar de tratarse de una especie leñosa, no se registraron problemas de oxidación. En la Figura 8 se muestran secciones nodales enraizadas obtenidas mediante organogénesis indirecta e indirecta.

3. *Eranthemum pulchellum* A y *Heteropteris angustifolia*

Los resultados exploratorios para establecer plantas madre para propagación, y evaluar su comportamiento muestran que *Eranthemum pulchellum* tiene una excelente adaptabilidad a situaciones de sombra y media sombra, logrando una expresión paisajística plena en cuanto al desarrollo de follaje y la floración a fines de invierno. En este momento, se encuentra en evaluación la medición de la radiación fotosintéticamente activa y variables ambientales en cada una de las situaciones a los fines de poder evaluar el límite de crecimiento y modelizar las situaciones en las que se puede utilizar el material vegetal. Respecto a *Heteropteris angustifolia* se logró su crecimiento y la producción de las primeras semillas durante el año 2019-2020 (Figuras 9 y 10).

4. *Quercus robur*

La sobrevivencia general de las plantas dispuesta en el ensayo, transcurridos 10 meses, es baja (58%), aun cuando

ANA (mg/l)	Enraizamiento (%)	Raíces/explante (n°)	Long de raíces(cm)	Explantes con brotes (%)	Explantes con callos (%)
t 0: 0	4,60	1,00	2,80	83,33	10
t 1: 1	16,67	1,00	1,80	58,33	16,66
t 2: 1,5	16,67	1,00	1,50	33,33	38,83
t 3: 3	37,04	1,67	1,07	18,75	47,91

Tabla 1. Efecto del ácido naftalenacético (ANA) sobre la organogénesis directa e indirecta de secciones nodales de *P. alpacato* cultivadas en condiciones *in vitro*.

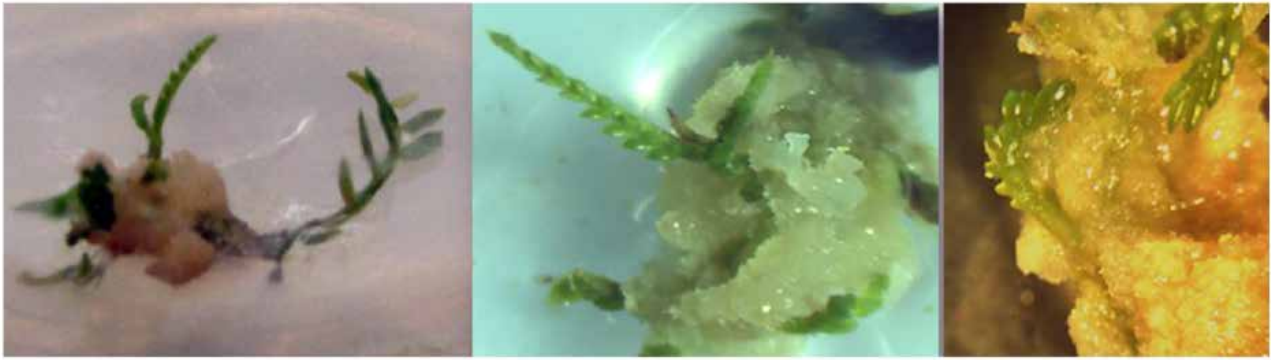


Figura 7. Múltiples brotes obtenidos por organogénesis indirecta de secciones nodales de *P. alpataco* cultivadas en MS libre de reguladores de crecimiento.

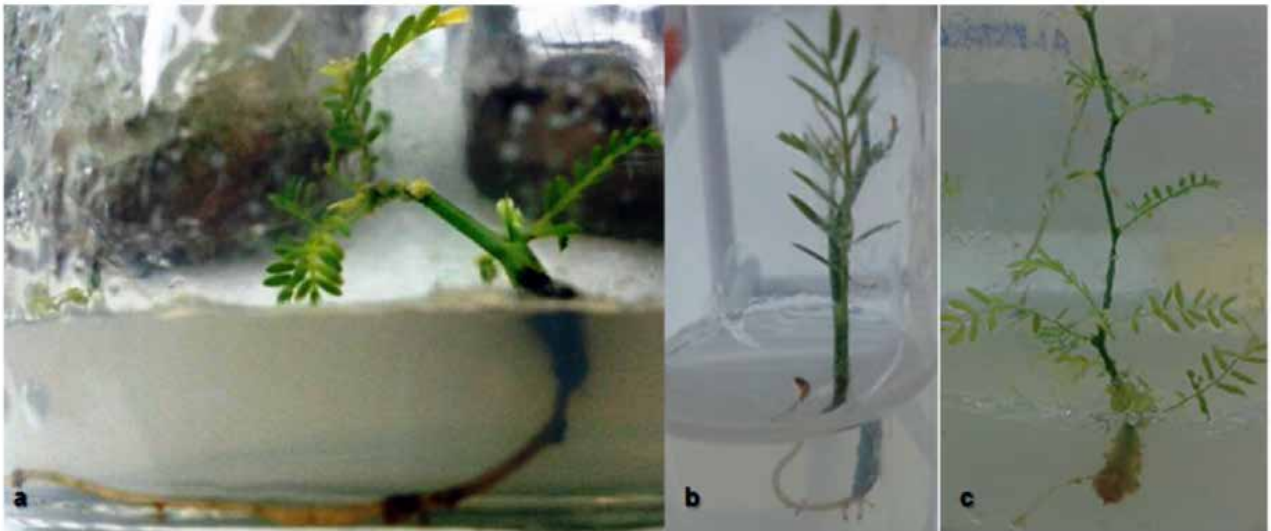


Figura 8. a y b) enraizamiento de secciones nodales vía organogénesis directa de *P. alpataco*; c) enraizamiento de secciones nodales vía organogénesis indirecta.



Figura 9 y 10. Plantación de plantas madre para provisión de semillas. Provincia de Buenos Aires. Año 2019.

	Fecha medición		
	nov-19	feb-20	jun-20
Sobrevivencia (%)	89%	68%	58%
Muertos	56	160	210
Vivos	444	340	290
Altura media (cm)	no medida	77,7	79,7

Tabla 2. Resultados preliminares luego de una temporada de crecimiento de plantas de *Quercus robur*, en la Estación Experimental Julio Hirschhorn. FCAYF – UNLP. Los Hornos, Pdo. de La Plata.

se realizaron 3 riegos durante el verano. Se observa un fuerte descenso de la sobrevivencia durante los meses de verano, pasando de 89% en noviembre 2019 a 68% en febrero 2020 (Tabla 2).

El análisis de los registros climáticos obtenidos del Boletín Agrometeorológico Mensual de la Estación Experimental Julio Hirschhörn señalan un período seco que se extendió durante todo el verano, con un almacenaje de agua en el perfil que no superó el 50% de capacidad de campo (300mm hasta 1m de profundidad en el suelo local), determinando una situación de almacenaje de sequía (Tabla 3).

Esta situación climática tuvo su correlato en la condición del suelo en las fajas laboreadas donde puntualmente se colocaron las plantas, al producirse importantes grietas y rajaduras asociadas a la contracción de las arcillas ante la desecación del perfil del suelo laboreado. Este fenómeno se observó en muchas de las plantas muertas, cuyos sistemas de raíces fueron afectados por los procesos de contracción y expansión del suelo producto de la fuerte desecación. Esto nos lleva a pensar que, dentro de la técnica de plantación manual con pala de punta, el aporque y apisonado constituye una tarea de singular importancia que debe realizarse muy cuidadosamente. Durante el período entre mediciones de altura, esta variable registró un incremento de apenas 2 centímetros en promedio. Este valor, aparentemente bajo, ha de interpretarse teniendo en consideración el crecimiento lento de esta especie, las condiciones de fuerte sequía antes descripta, y que se trata de plantas en proceso de instalación. En relación a la presencia o no de hojas secas unidas en las plantas al momento de plantación en invierno 2019, se realizó un seguimiento de la brotación

de los 2 grupos, con el propósito de detectar posibles diferencias en esta variable. Los resultados indican que las plantas con hojas presentaron mayor mortalidad post plantación que aquellas sin hojas (Figura 11).

Los resultados, aunque preliminares, podrían aplicarse para seleccionar los materiales de propagación en el vivero, evitando en la medida de lo posible emplear plantas que mantengan adheridas las hojas en invierno. No obstante, es necesario continuar con estudios en este tema. Durante el invierno 2020 se realizó una reposición parcial de las plantas muertas, a fin de completar la parcela. Se prevé continuar con la medición anual del ensayo puesto que para la región no existen antecedentes documentados de cultivo en plantaciones forestales con objetivo maderable de *Quercus robur* L.

Conclusiones

Se presentaron resultados preliminares sobre la propagación de algunas especies de interés para Argentina que tienen diversos usos. Se ha logrado avanzar en el conocimiento de la producción de semillas de *Polylepis tarapacana*, leñosa de importancia en bosques de altura. En *Prosopis alpataco* se indujo organogénesis indirecta *in vitro*. Se avanzó en la macro propagación de dos especies ornamentales interesantes para techos verdes y paisajismo. Si bien son resultados exploratorios, estos indican que el propósito integrador de este Proyecto puede alcanzarse. Esperamos generar conocimiento para la caracterización, conservación *in situ* y *ex situ* y propagación de bajo costo de germoplasma vegetal con el fin de mantener la

Mes	Pptación acum (mm)	Temp prom max (°C)	Temp suelo prom max (°C)	ETP (mm)	Situación almacenaje
oct-19	214,4	20,5	15,1	102,4	NORMAL
nov-19	34,8	26,6	19,6	145,8	ESTRÉS
dic-19	82,2	28,4	20,3	170,2	SEQUÍA
ene-20	61,8	29,1	16,6	175,7	SEQUÍA
feb-20	77,6	28,6	22,8	150	SEQUÍA
mar-20	104	27,7	21,7	110,4	SEQUÍA
abr-20	114,8	21,4	17,4	76,7	SEQUÍA

Tabla 3. Registros agroclimáticos para el período post plantación en la Estación Experimental Julio Hirschhörn. FCAyF – UNLP. Los Hornos, Pdo. de La Plata.



Figura 11. Sobrevivencia de las plantas en el campo, de acuerdo al tipo de planta que proviene del vivero.

diversidad biológica, y proveer a diferentes usuarios de material vegetal de calidad, con su paquete tecnológico asociado (protocolos de propagación, producción en viveros, y manejo a campo) para posicionarnos en el nuevo paradigma de la economía circular o bioeconomía basada en la biodiversidad y la biotecnología. La producción de plantas para abastecer un mercado cada vez más demandante en cantidad y calidad, requiere, sin duda, de un sistema eficiente de propagación, que incluya el uso de técnicas tradicionales y de las biotecnologías. Asegurar que los productores, silvicultores, paisajistas y restauradores tengan un acceso oportuno a semillas y a material de propagación de buena calidad es uno de los elementos más importante de una producción y desarrollo exitosos¹. El grupo de trabajo, dentro del LIMAD, apunta a convertirse en proveedor de tecnología básica para la producción de algunas especies vegetales de múltiples usos, para las cuales se está completando su caracterización y sistema de reproducción. El paquete tecnológico a desarrollar incluirá la asesoría especializada y, eventualmente, el desarrollo de nuevos productos, ya que las técnicas a instalar pueden extenderse a otras especies que demande el mercado.

Referencias bibliográficas

1. FAO 195. Material de propagación de calidad declarada ESTUDIO FAO PRODUCCIÓN Y PROTECCIÓN VEGETAL 195 Protocolos y normas para cultivos propagados vegetativamente Consulta de expertos Lima, 27-29 de noviembre de 2007 Coordinada por Juan Fajardo, NeBambi Lutaladio, Michael Larinde y Cadmo Rosell División de Producción y Protección Vegetal de la FAO y Ian Barker, Willy Roca y Enrique Chujoy Centro Internacional de la Papa (CIP)
2. Bisognin, Dilson Antônio. (2011). Breeding vegetatively propagated horticultural crops. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11(spe), 35-43. <https://doi.org/10.1590/S1984-70332011000500006>
3. Morales, M.S., R. Villalba, H.R. Grau & L. Paolini. 2004. Rainfall controlled tree growth in high elevation subtropical treelines. *Ecology*, 85: 3080-3089.
4. Rada, F., C. García-Núñez, C. Boero, M. Gallardo, M. Hilal, J. González, F. Prado, M. Liberman-Cruz & A. Azócar. 2001. Low temperature resistance in *Polylepis tarapacana*, a tree growing at the highest altitudes in the world. *Plant, Cell & Environment* 24: 377-381.
5. Azócar, A., F. Rada & C. García-Núñez. 2007. Functional characteristics of the arborescent genus *Polylepis* along a latitudinal gradient in the high Andes. *Interciencia* 32: 663-666.
6. Kessler, M. 1995. The genus *Polylepis* (Rosaceae) in Bolivia. *Candollea* 50: 131-171.
7. Beck, S.G., A.I. Domic, C. García, R.I. Meneses, K. Yager & S. Halloy. 2010. Museo Nacional de Historia Natural. La Paz, Bolivia. 253 pp.
8. Cabrera, Á.L. 1971. Fitogeografía de la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 14: 1-42.
9. Renison, D., I. Hensen, R. Suárez, A.M. Cingolani, P. Marcora & M.A. Giorgis. 2010. Soil conservation in *Polylepis* mountain forests of Central Argentina: Is livestock reducing our Natural capital? *Austral Ecology* 35: 435-443.
10. Moore, M. 1986. Manual de ensayos al tetrazolio. Comité de tetrazolio de la asociación internacional de ensayos de semillas. Madrid. 92 pp.
11. Boeri P y Sharry S. 2018. Somatic embryogenesis of alpataco (*Prosopis alpataco* L.). In: *Forestry Sciences*, Shri Mohan, Jain and Pramod Gupta (Eds). Vol 85: Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants, Vol II Chapter 16: 189:198. ISSN 0924-5480. DOI 10.1007/978-3-319-79087-9 Springer International Publishing. 451pp.
12. Bertoli, B. Análisis de crecimientos iniciales de plantación de *Quercus robur* en Lobería, Pcia. de Buenos Aires, Argentina. Disponible en https://www.academia.edu/14744812/An%C3%A1lisis_de_crecimientos_iniciales_de_plantaci%C3%B3n_de_Quercus_robur_en_Loberia_Pcia_de_Buenos_Aires_Argentina
13. Jovanovic, M. y Tucovic, A. 1975. Genetics of common and sessile oak (*Quercus robur* L. and *Q. petraea* Liebl.) *Anales forestales*. 7: 23-53.
14. Kleinschmit, J. 1993. Intraspecific variation of growth and adaptive traits in European oak species. *Ann. Sci. For.* (1993) 50, Suppl. 1
15. Domic, A.I., E. Mamani & G. Camilo. 2013. Fenología reproductiva de la kewiña (*Polylepis tomentella*, Rosaceae) en la puna semi-húmeda de Chuquisaca (Bolivia). *Ecología en Bolivia* 48 (1): 31-45.
16. Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.

Received: 23 noviembre 2020

Accepted: 10 enero 2021

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Interactoma de predisposición y resistencia a SARS-CoV-2. Proteínas, genes y funciones

Interactome of predisposition and resistance to SARS-CoV-2. Proteins, genes, and functions

César Paz-y-Miño, Ana Karina Zambrano, Paola E. Leone

DOI. [10.21931/RB/2021.06.01.17](https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.01.17)

Resumen: Se ha informado que la infección por SARS-CoV-2 tiene al menos tres aspectos: la capacidad patogénica del virus, la susceptibilidad y la interacción virus-huésped en un ambiente. Para varios virus, está demostrado que tienen receptores celulares específicos de unión con las células y son determinantes en la entrada o no del virus a las células. Para el virus SARS-CoV-2, se conoce que el receptor ACE2 (Enzima Convertidora de Angiotensina 2), es clave para que el virus se adhiera a la membrana celular del epitelio pulmonar, al neumocito. El receptor ACE2 tiene su gen específico con el mismo nombre localizado en el cromosoma Xp22.2 y tiene a su vez interacciones con algunos genes. Nos propusimos encontrar interacciones de proteínas que tengan relación con la entrada, sintomatología y progreso de la COVID-19 y con otras proteínas similares o coadyuvantes. Estas interacciones son extremadamente importantes para entender la fisiopatología de la enfermedad y los diversos grados de afectación que se han observado asintomáticos, leves, moderados, graves y críticos, lo que se conoce como heterogeneidad clínica. La heterogeneidad en los síntomas es probable que refleje una heterogeneidad de interacciones de proteínas que se encuentran interrelacionadas con la infección por el virus COVID-19 y su correlación entre sí. La meta final es encontrar los genes que comandan estas interacciones proteicas y asociarlas con la variación clínica. Este es un estudio inicial de interactoma proteico para continuar con el análisis de proteínas específicas y sus variantes en la población ecuatoriana.

1555

Palabras clave: Interactoma, ACE2, SARS-CoV-2, interacción de genes, predisposición.

Abstract: The SARS-CoV-2 infection has been reported to have at least three aspects: the pathogenic capacity of the virus, susceptibility, and virus-host interactions. For several viruses, it has been demonstrated that they have specific cell-binding receptors and are determinant in whether or not the virus enters the cells. For the SARS-CoV-2 virus, the ACE2 receptor (Angiotensin Converting Enzyme 2) is known to be critical for the virus to adhere to the cell membrane of the lung epithelium, the pneumocyte. The ACE2 receptor has its specific gene with the same name on the Xp22.2 chromosome and has interactions with some genes. We set out to find protein interactions related to the entry, symptomatology, and progress of COVID-19 and other similar or adjuvant proteins. These interactions are fundamental to understanding the disease's physiopathology and the different degrees of affectation observed asymptomatic, mild, moderate, severe, and critical, known as clinical heterogeneity. The heterogeneity in the symptoms is likely to reflect the heterogeneity of protein interactions related to the infection by the virus COVID-19 and its correlation between them. The final goal is to find the genes that command these protein interactions and associate them with a clinical variation. This is an initial study of protein interaction to continue with analyzing specific proteins and their variants in the Ecuadorian population.

Key words: Interactome, ACE2, SARS-CoV-2, genes interactions, predisposition.

Introducción

Existen informes que la infección por el coronavirus SARS-CoV-2 a humanos tiene al menos tres aspectos interrelacionados, la capacidad patogénica del virus, la susceptibilidad o resistencia del huésped a la infección que tiene que ver con la genética e inmunidad, y la interacción virus-huésped en un ambiente (micro o macro) determinado, es decir efectos epigenéticos¹⁻³.

Se ha estudiado muchos procesos de infecciones virales, bacterianas, micóticas y parasitarias, en que las propiedades biológicas y moleculares del organismo infectante, no son las únicas para que se produzca una infección. Para los virus, se conoce que los receptores celulares específicos de unión con las células son determinantes en la entrada o no del virus a las células. Así por ejemplo el VIH, necesita de los receptores CCR5 y CXCR4 para que el virus se adhiera a la célula y deposite su material genético en su interior^{4,5}. La interacción, proteína viral con receptor celular en el SARS-CoV-2 es clave para la enfermedad, aunque la totalidad de sus receptores específicos no se los conoce con exactitud.

Se conoce que el receptor ACE2 (Enzima Convertidora de Angiotensina 2) es clave para que el SARS-CoV-2 se adhiera a la membrana celular del epitelio pulmonar, al neumocito⁶⁻⁸. Por tanto, encontrar las interacciones de esta proteína con otras similares o coadyuvantes, es extremadamente importante para entender la fisiopatología de la enfermedad y los diversos grados de afectación que se han observado⁹. Esta proteína está originada en un gen del mismo nombre que se localiza en el cromosoma Xp22.2 y que interactúa con muchos genes.

Está descrito que el virus produce una heterogeneidad clínica en los pacientes, quienes pueden ser asintomáticos, otros con síntomas leves, moderados y los hay también con sintomatología grave y crítica^{10,11}.

Considerando esta heterogeneidad clínica y la interrelación virus-huésped, es legítimo asegurar que los determinantes genéticos individuales y poblacionales juegan un papel trascendental en la presencia o no de la enfermedad, en la incidencia etaria y geográfica diferente^{6,10}. Las variantes proteicas del huésped tienen sin duda relación con las variantes genéticas

que en última instancia determinan la estructura de proteínas.

Para entender esta relación virus-huésped y su compleja heterogeneidad, se realizó un estudio *in silico* de la interacción de las posibles proteínas involucradas en la infección y la respuesta al virus, así como estudiamos los datos de secuenciación masiva en nuestro Centro.

Materiales y métodos

Búsqueda Bibliográfica

Al ser una enfermedad nueva, para el análisis de genes de resistencia y predisposición y su posterior estudio de interacciones, partimos de una amplia revisión de la literatura que sugiera o demuestre los factores que intervienen en la infección. Se realizó un interactoma que identifique las proteínas específicas involucradas en la adhesión y entrada del virus, así como, los signos, síntomas y progresión de la COVID-19.

Se utilizó el programa STRING: functional protein association networks v. 11.0 (string.com)¹² en donde se ingresó las proteínas encontradas según literatura para de esta manera ver si existe una posible relación entre las mismas en el software Cytoscape v3.8.1¹³ se ingresó la proteína y el virus para conocer las relaciones que existen.

Toda la documentación revisada parte de la proteína ACE2 descrita como la esencial en la infección, por tanto, en el análisis es el eje central. Luego se correlacionó con los datos fisiopatológicos de la COVID-19 que resumen dos aspectos esenciales en la clínica de la enfermedad: un cuadro similar a una reacción antifosfolípida, y un cuadro asociado de hiperinflamación mediada por una sobrecarga de macrófagos y citoquinas, estas correlaciones las profundizamos según la agrupación sindrómica más evidente de la COVID como la respuesta inmune, sintomatología pulmonar, cardiovascular y renal.

Priorización de proteína

Se parte de una aproximación inicial de 23 mil proteínas encontradas luego de la revisión bibliográfica y el filtrado de las proteínas que se han visto según evidencia están más involucradas en la entrada y respuesta inmune del virus. Posteriormente se realizaron consecutivas priorizaciones más profundas, tomando en cuenta únicamente las proteínas que muestren interacción entre sí y que se encuentren relacionadas directamente a COVID-19 y su cuadro clínico. Las interacciones evaluadas fueron de primera línea de interacción, segunda línea de interacción y proteínas probables de interacción. El análisis prioriza bases de datos de proteínas determinadas experimentalmente, con conocimiento de funciones de genes originarios, coocurrencia de genes, genes vecinos, co-expresiones de proteínas genéticamente determinadas y por homología de proteínas.

Adicionalmente, realizamos el análisis de las bases de datos de 10 individuos ecuatorianos, en quienes tenemos resultados de secuenciación masiva para 4813 genes, es decir un análisis de 48130 secuencias, aplicando la tecnología del equipo Illumina MiSeq. Para el grupo de individuos ecuatorianos, filtramos la información de nuestra base de datos, de acuerdo a la priorización de genes.

Resultados

Se realizó un análisis *in silico* usando el software String y Cytoscape para la proteína multifunción ACE2, descrita como

la principal vía de entrada del virus al organismo. Esta proteína tiene interacción con otras proteínas que actúan como receptoras o correceptoras para el virus las cuales son TMPRSS2, NRP1, AGTR1, MAS1, IFITMs y las distintas interacciones con secuencias específicas del virus SARS-CoV-2 y proteínas en el citoplasma o extracelulares. También se analizan los medicamentos que se encuentran disponibles hasta el momento, de acuerdo a su función específica sobre las proteínas: cloriquina, aloxistatina, camostat (Fig. 1).

Partiendo del análisis inicial de proteínas receptoras y del virus informadas en la bibliografía, se obtuvo un total de 23 mil proteínas, se priorizó la información tomando en cuenta las proteínas que según bibliografía mostraban estar envueltas dentro de la adhesión a membrana celular y entrada del virus y desencadenamiento de la enfermedad, se obtuvieron 101 proteínas correlacionadas entre sí. Después de una posterior priorización tomando en cuenta únicamente las proteínas que tengan interacción entre sí, se determinó 45 proteínas, de las cuales, 38 proteínas tienen fuerte o mediana correlación según lo predicho por el software STRING.

Once de estas proteínas son las que mostraron interacciones y co-expresiones fuertes: ACE2 con AGT, AGTR1 y 2, REN, MME, PRCP, MEP1A y B, XPNPEP2 y DPP4 (Fig. 2). El análisis muestra que seis proteínas tienen homología funcional y actúan correlacionadamente. Solamente en DPP4 no ha sido probada experimentalmente su función directa en asociación con ACE2, mientras que todos los demás tienen correlaciones tan altas como 0,991 para AGT o las más bajas de 0,858 para AGTR2. La correlación media de estas once proteínas es de 0,844. La Tabla 1, muestra los posibles genes específicos para las once proteínas interactuantes, así como localización y función.

Las once proteínas más correlacionadas están involucradas en las funciones de renina-angiotensina, el angiotensinógeno, carboxipeptidasas, beta meprina, por lo que controlan funciones como la presión arterial sistémica, volumen sanguíneo, producción de aldosterona, degradación de proteínas, señalización adrenérgica en cardiomiocitos, interacción ligando receptor neuroactivo, metabolismo de hormona peptídica e implicación en el sistema de las rodopsinas.

En un segundo análisis de priorización, se encontró interacciones entre 21 proteínas, las cuales involucran nuevas actividades sobre control hormonal de la presión sanguínea, cuatro tienen función asociada a la adicción a la morfina y su degradación, y dos tienen asociación funcional con el glucagón. Todo esto con una correlación de 0,74.

Los posteriores análisis del interactoma para 31 proteínas hasta 101, dieron una correlación media de 0,748, evidenciando asociaciones funcionales que participan en el volumen sanguíneo y la circulación, señalización de las relaxinas y quimiocinas; dos proteínas tienen función en endotelios y cuatro se relacionan con actividad proteasa similar a la tripsina, por lo que participarían en la degradación de tejidos. Se muestran funciones relacionadas con la respuesta a fármacos sobre renina y sobre respuestas farmacológicas a los moduladores de renina-angiotensina. Todas estas funciones, descritas y asociadas a la fisiopatología de la COVID-19.

El análisis de asociación de 101 proteínas (Fig. 3), dio como resultado un coeficiente de correlación de 0,676 y muestra similares funciones a las descritas para el clúster de once proteínas, pero se evidencia nuevas funciones como calidad biológica (peso, talla, tamaño de órganos, color, masa, etc.) características claramente epigenéticas con 83 proteínas, 54 proteínas tienen función en la membrana plasmática celular. A este nivel de correlación se aprecian 21 proteínas que coadyuvan en la desregulación de la renina-angiotensina, con los

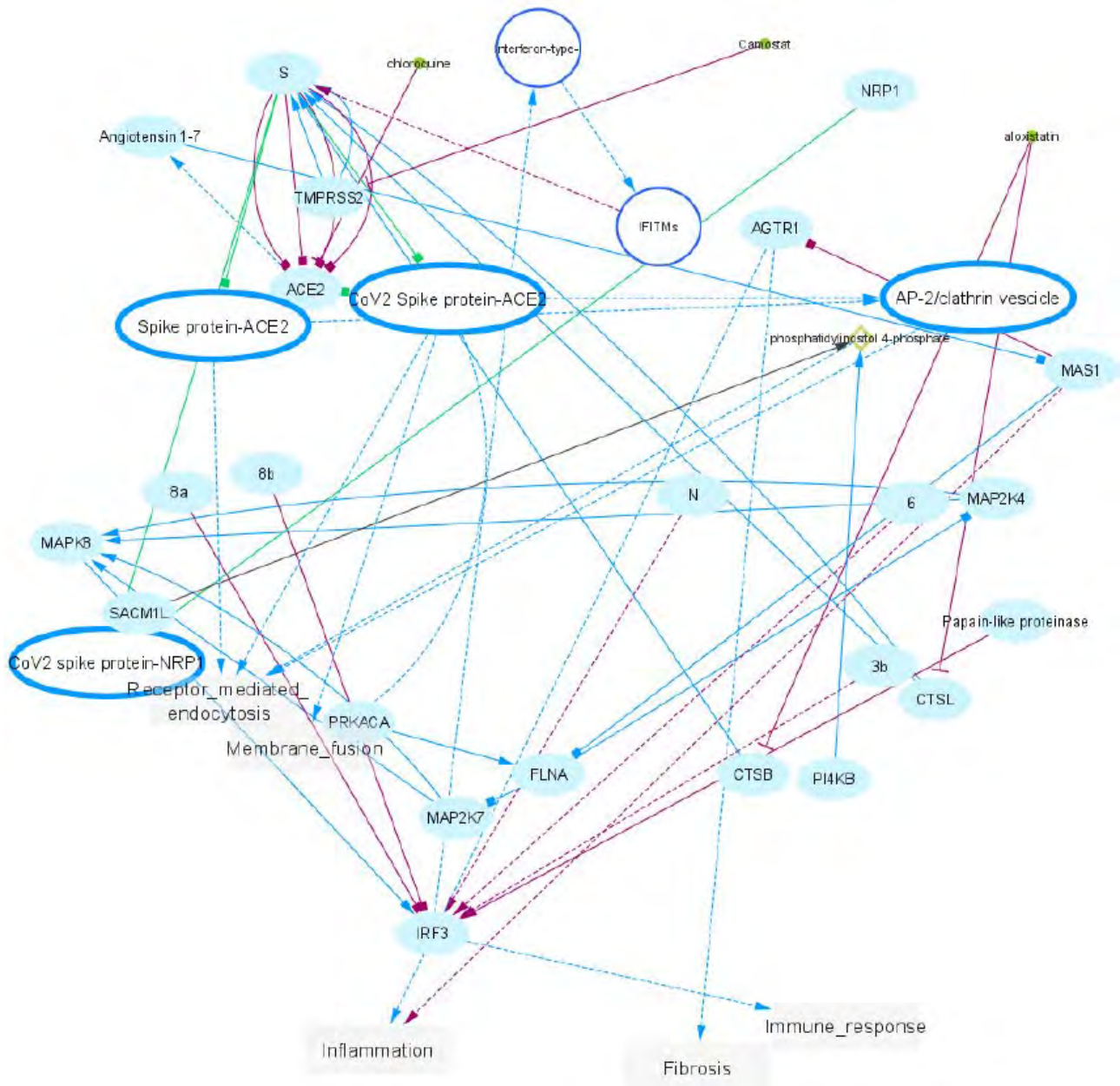


Figura 1. Interrelación proteínas víricas con proteínas receptoras del virus SARS-CoV-2. Se muestran los fármacos y su interacción proteica. Construida en Cytoscape.

consiguientes efectos fitopatológicos descritos para la enfermedad. También encontramos 27 proteínas involucrados en quimiorreceptores que, como se conoce, están involucrados en el acoplamiento de proteínas, fármacos, etc. Se encontró 15 proteínas incluidas en el desarrollo de cáncer.

Al analizar las posibles proteínas de predisposición y resistencia al SARS-CoV-2, de las bases de datos de secuenciación masiva de individuos ecuatorianos, encontramos que, existe una correlación en 30 proteínas, de las cuales los siguientes: ACE2, ACE1, ACACA, HGD, TICAM1, TLR7, ROS1, ACACA, XPNPEP2, MEP1B, PRCP, MME, REN, AGTR, AGTR1 y AGTR2, evidencian una mayor asociación, con un coeficiente de correlación de 0,54, según se muestra en la Fig. 4.

Discusión

El presente trabajo consiste en un análisis *in silico* de prio-

rización de proteínas que parten de conocimientos previos bibliográficos y que se encuentran conexas directamente con la infección, sintomatología, severidad y progresión de COVID-19, y revisa los datos de 10 individuos ecuatorianos a quienes se realizó la secuenciación masiva de 4813 genes. El análisis parte de 23 mil proteínas y luego de varios filtros aplicados se filtró 101 proteínas, luego 45, 38, 21, hasta llegar a 11 que se encuentran más fuertemente relacionadas con el receptor ACE2 adherente de la proteína de espiga (S) del SARS-CoV-2^{1,2,7,12,13}. Este análisis es importante en la actualidad, ya que al no existir conocimientos previos de interacciones proteicas para la unión virus-huésped, evidenciar interacciones nos llevan a entender el proceso fisiopatológico de la enfermedad.

En el primer análisis realizado en Cytoscape de proteínas receptoras de entrada del virus con la interacción con las proteínas del virus se obtuvieron varias proteínas descritas también en bibliografía: según Mousavizadeh y Ghasemi (2020)

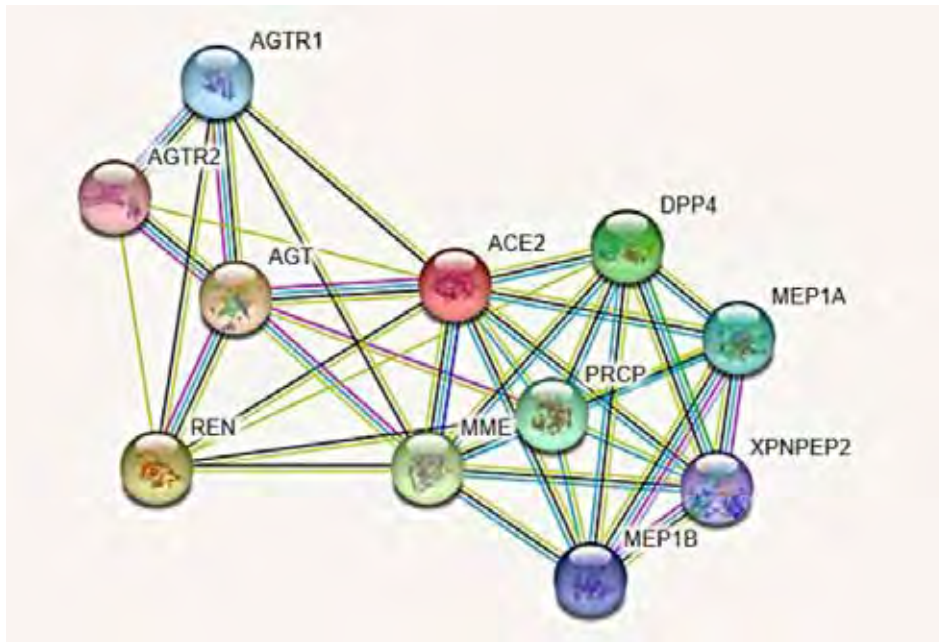


Figura 2. Interactoma inicial de 11 proteínas a partir de ACE2. El nodo rojo es la proteína de consulta, los nodos blancos son la segunda capa de interactores. La línea de unión turquesa representa interacciones de bases de datos seleccionados; rosada, determinada experimentalmente; verde oscuro gen vecino; rojo, fusiones de genes; azul, co-ocurrencia de genes; verde claro, extraído de bibliografía; negro, co-expresión; celeste, homología de proteínas.

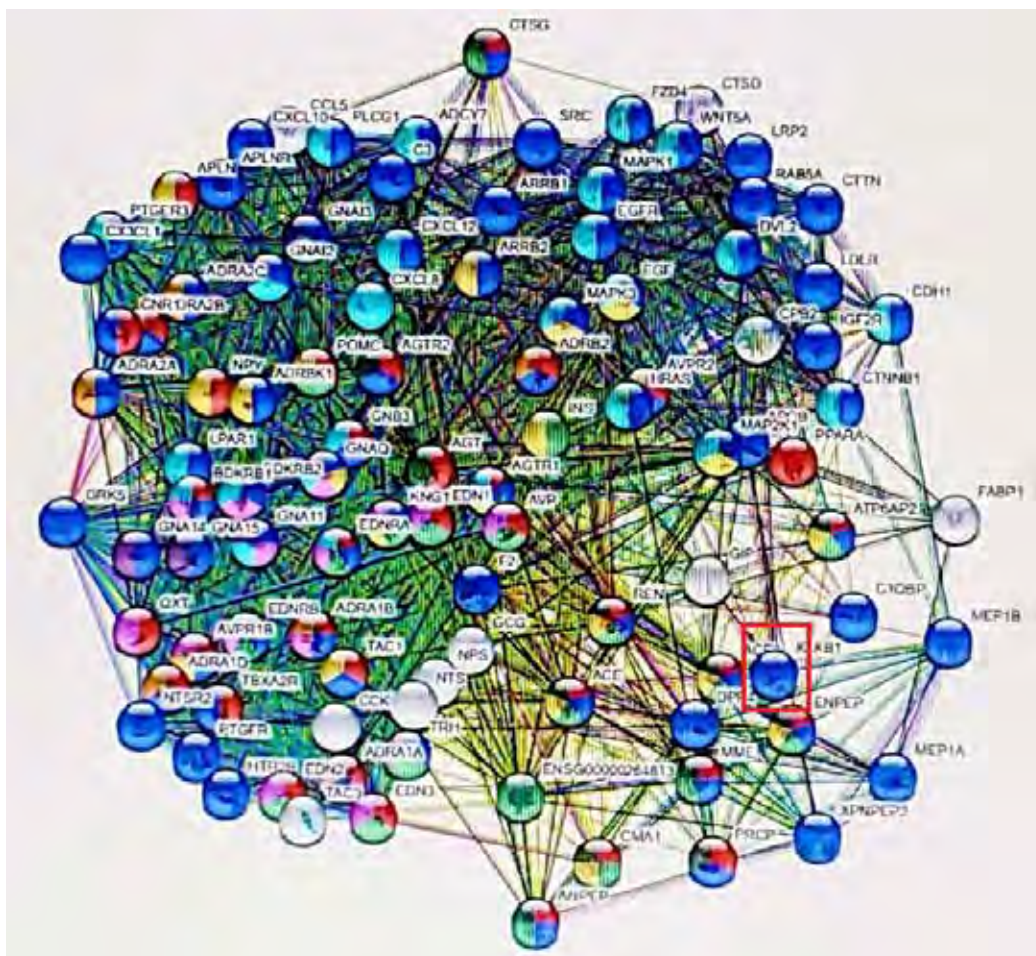


Figura 3. Interactoma para 101 proteínas a partir de ACE2. El nodo rojo es la proteína de consulta, los nodos blancos son la segunda capa de interactores. Línea de unión turquesa, interacciones de bases de datos seleccionados; rosada, determinada experimentalmente; verde oscuro, gen vecino; rojo, fusiones de genes; azul, co-ocurrencia de genes; verde claro, extraído de textos; negro, co-expresión; celeste homología de proteínas.

GEN	NOMBRE	UBICACIÓN CROMOSÓMICA	FUNCIÓN
ACE2	Enzima convertidora de angiotensina 2	Xp22.2	Gen codificador de proteínas. Las enfermedades asociadas con la ECA2 incluyen Covid-19 y el síndrome respiratorio agudo severo. Entre sus vías relacionadas se encuentran la trimerización de la cadena de colágeno y el metabolismo de hormonas peptídicas. Las anotaciones de Gene Ontology (GO) relacionadas con este gen incluyen la actividad metalopeptidasa y la unión de péptidos. Un parámetro importante de este gen es ACE.
AGT	Angiotensinógeno	1q42.2	Gen codificador de proteínas. Las enfermedades asociadas con la AGT incluyen la disgenesia tubular renal y la hipertensión, esenciales. Entre sus vías relacionadas se encuentran la neurociencia y el transporte de monoaminas. Las anotaciones de Gene Ontology (GO) relacionadas con este gen incluyen la actividad del factor de crecimiento y la actividad del inhibidor de la endopeptidasa de tipo serina.
AGTR1	Receptor de angiotensina II tipo 1	3q24	Gen codificador de proteínas. Las enfermedades asociadas con AGTR1 incluyen disgenesia tubular renal e hipertensión, esencial. Entre sus vías relacionadas se encuentran la endocitosis mediada por clatrina y la señalización de RET. Las anotaciones de Gene Ontology (GO) relacionadas con este gen incluyen la actividad del receptor acoplado a proteína G y la actividad del receptor de la angiotensina tipo II. Relación directa con el gen AGTR2.
AGTR2	Receptor de angiotensina II tipo 2	Xq23	Gen codificador de proteínas. Las enfermedades asociadas con AGTR2 incluyen la discapacidad intelectual no síndromica ligada al cromosoma X y la nefropatía obstructiva. Entre sus vías relacionadas se encuentran la señalización por GPCR y los agentes que actúan sobre la vía del sistema renina-angiotensina, farmacodinámica. Las anotaciones de Gene Ontology (GO) relacionadas con este gen incluyen la actividad del receptor acoplado a proteína G y la unión de hormonas peptídicas. Relación directa con el gen AGTR1.
REN	Renina	1q32.1	Gen codificador de proteínas. Las enfermedades asociadas con la REN incluyen la nefropatía hiperuricémica, la disgenesia familiar juvenil 2 y la disgenesia tubular renal. Entre sus vías relacionadas se encuentran el metabolismo de las hormonas peptídicas y los agentes que actúan sobre la vía del sistema renina-angiotensina, farmacodinámica. Las anotaciones de Gene Ontology (GO) relacionadas con este gen incluyen la unión al receptor de señalización y la actividad endopeptidasa.
MME	Metaloendopeptidasa de membrana	3q25.2	Gen codificador de proteínas. Las enfermedades asociadas con MME incluyen enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, axonal, tipo 2T y ataxia espinocerebelosa 43. Entre sus vías relacionadas se encuentran la trimerización de la cadena de colágeno y el metabolismo de hormonas peptídicas. Las anotaciones de Gene Ontology(GO) relacionadas con este gen incluyen la actividad peptidasa y la actividad endopeptidasa. Relacionado directamente con el gen MME1.
PRCP	Prolifcarboxipeptidasa	11q14.1	Gen codificador de proteínas. Las enfermedades asociadas con PRCP incluyen la deficiencia de piruvato quinasa de glóbulos rojos y la anemia hemolítica congénita no esférica. Entre sus vías relacionadas se encuentran la trimerización de la cadena de colágeno y la formación de coágulos de fibrina (cascada de coagulación). Las anotaciones de Gene Ontology (GO) relacionado con este gen incluyen la actividad peptidasa de tipo serina y la actividad carboxipeptidasa de tipo serina. Un parámetro importante de este gen es DPP7.
MEP1A	Subunidad alfa de la meprina A	6p12.3	Gen codificador de proteínas. Las enfermedades asociadas con MEP1A incluyen encefalitis de Powassan y Louping Ill. Entre sus vías relacionadas se encuentran la trimerización de la cadena de colágeno. Las anotaciones de Gene Ontology (GO) relacionadas con este gen incluyen la actividad metaloendopeptidasa y la actividad metalopeptidasa. Relacionado directamente con el gen MEP1B.
MEP1B		18q12.1	Meprin A Subunit Beta) es un gen codificador de proteínas. Las enfermedades asociadas con MEP1B incluyen encefalitis de Powassan y sordera autosómica dominante 31. Entre sus vías relacionadas se encuentran la señalización Signal transduction PKA y la trimerización de la cadena de colágeno. Las anotaciones de Gene Ontology Genética (GO) relacionadas con este gen incluyen la actividad metaloendopeptidasa y la actividad metalopeptidasa. Relacionado directamente con el gen MEP1A.
XPNPEP2	X-Prolyl Aminopeptidase 2	Xq26.1	Gen codificador de proteínas. Las enfermedades asociadas con XPNPEP2 incluyen angioedema inducido por inhibidores de Ace y angioedema. Entre sus vías relacionadas se encuentran la trimerización de la cadena de colágeno y el metabolismo de proteínas. Las anotaciones de Gene Ontology (GO) relacionadas con este gen incluyen la actividad hidrolasa y la actividad aminopeptidasa. Relacionado directamente con el gen XPNPEP1.
DPP4	Dipeptidil peptidasa 4	2q24.2	Gen codificador de proteínas. Las enfermedades asociadas con DPP4 incluyen el síndrome respiratorio de Oriente Medio y la nasofaringitis. Entre sus vías relacionadas se encuentran la trimerización de la cadena de colágeno y la síntesis, secreción e inactivación de incretinas. Las anotaciones de Gene Ontology (GO) relacionadas con este gen incluyen la actividad de homodimerización de proteínas y la unión al receptor de señalización.

Tabla 1. Genes, localización y función de aquellos correlacionados con predisposición o resistencia a la infección por SARS-COV-2

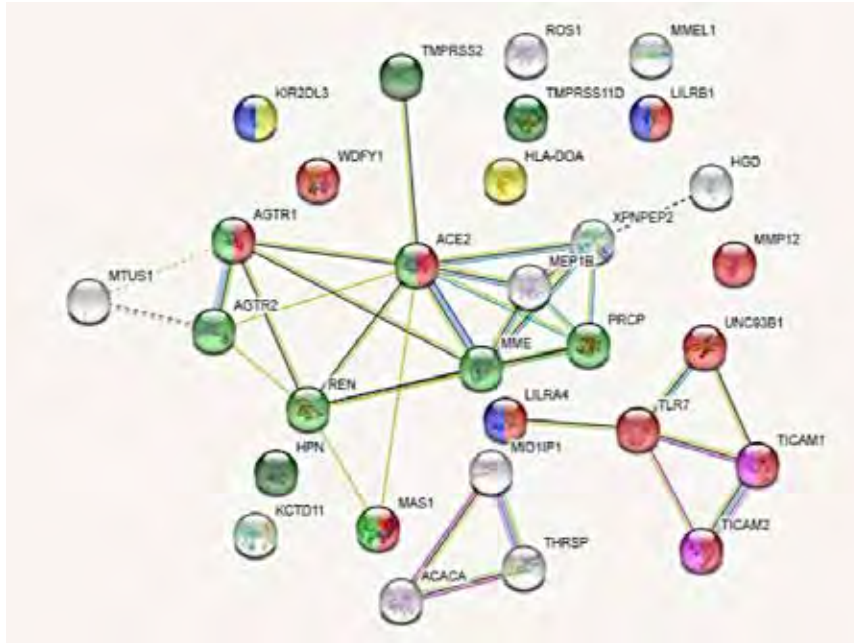


Figura 4. Interactoma de personas infectadas por el SARS-CoV-2 que son asintomáticos, con sintomatología leve, moderada y grave.

al igual que otras investigaciones, el virus SARS-CoV-2 usa la proteína TMPRSS2 para completar la entrada a la célula, debido a que la proteína S del receptor del virus se pega a la ligando de ACE2 mediante la activación de TMPRSS2 como proteasa;¹⁴⁻¹⁸ según Cantuti *et. al* (2020) y Daly *et. al* (2020), la proteína NRP1 actúa en la entrada del virus a la célula en vez de usar ACE2, esto debido a la gran expresión del mismo en células epiteliales permitiendo la entrada celular, vascular y tisular;^{19,20} la proteína AGTR1, también encontrada dentro de nuestras interacciones proteína-proteína, otras investigaciones revelan que su expresión está relacionada a posibles daños pulmonares;^{21,22} algunas investigaciones han identificado a la proteína MAS1 que se encuentra en células endoteliales como un receptor del ligando ACE2, que incluso deficiencias pueden causar insuficiencia cardíaca sistólica, incrementar la presión sanguínea, entre otras;²³⁻²⁵ las proteínas IFITMs han mostrado en varias investigaciones que están involucradas en promover la infección causada por el virus^{26,27}.

El análisis del interactoma ACE2 para COVID-19 arrojó paralelamente datos sobre actividad de algunos fármacos sobre la enfermedad que fueron utilizados en algún momento para tratar a pacientes, los resultados al reanalizarlos determinaron que se deje de usarlos por diferentes reacciones adversas. Tres fármacos encontrados en el análisis por software, llamaron nuestra atención: cloriquina droga diseñada inicialmente para la malaria, que se ha discutido mucho sobre su efectividad para tratar la COVID-19, se han realizado varias investigaciones *in vivo*, sin embargo, no puede considerarse hasta el momento como un medicamento definitivo para curar la enfermedad pudiendo incluso tener efectos secundarios graves como toxicidad;²⁸⁻³¹ aloxistatina fue un medicamento inicialmente diseñado para tratar la distrofia muscular y en varias investigaciones se ha probado su efectividad para el tratamiento de la COVID-19, es un inhibidor de la cistina proteasa la misma que ha sido confirmada su requerimiento para la entrada del virus sugieren varias investigaciones que el tratamiento con este medicamento reduce la entrada a la célula en un 92.3%;³²⁻³⁴ camostat fue otro medicamento diseñado para tratar la pancreatitis pero re direccionado para tratar la COVID-19, es un inhibidos de proteasa que según varias investigaciones inhibe

a TMPRSS2 bloqueando el desarrollo y patogénesis del virus, esto dependiendo de la dosis que vaya a ser usada en los pacientes ha sido recomendado como antiviral³⁵⁻³⁷.

Las proteínas que mostraron una correlación fuerte ACE2, han sido descritas en la bibliografía por tener alguna relación directa con la entrada o pronóstico del virus, según Xu, *et. al*, (2020), AGT es de las proteínas principales que interactúan con ACE2 después de la unión del virus SARS-CoV-2;¹³ según Milne *et. al* (2020), la expresión de la proteína AGTR1 ha mostrado ser protectora ante daños al pulmón, por lo que en pacientes con COVID-19 severo se ha visto que bajan los niveles de AGTR1 mientras suben los de ACE2;¹³ según Cui *et. al* (2020), la proteína AGTR2 tiene una interacción importante con ACE2, teniendo a si vez una gran afinidad con la proteína Spike del virus 2019-nCoV, permitiendo su entrada, por lo que podría ser considerado como una proteína de entrada del virus a las células;³⁸ la proteína REN mostró tener relación con ACE2 después de un análisis realizado por Tas *et. al* (2020), teniendo esta proteína un rol principal en la homeostasis de sodio, balance de fluidos y presión sanguínea;³⁹ Zolfaghari, Falak and Bahareini (2020), realizaron un estudio de asociación para la patogénesis de SARS-CoV-2 y encontraron que la proteína MME tiene una asociación directa con patogénesis en órganos respiratorios, renales y sistema sanguínea debida que causa una concentración de CO₂ en la sangre lo que causa edema pulmonar y fallo renal o pulmonar;⁴⁰ Goothy y Kumar (2020) realizaron una red de proteínas de interacción con ACE2 similar al presente estudio, en donde encontraron que la proteína PRCP está relacionada a unión de la membrana del virus;⁴¹ de igual manera según Goothy y Kumar (2020), las proteínas MEPIA, MEPIB, XPNPEP2 y DPP4 son parte de la interacción de unión de membrana junto con ACE2 y otras proteínas con el virus⁴¹.

Quince proteínas del interactoma están incluidas en el desarrollo de cáncer. lo que es llamativo porque el gen ACE2 participa también en la metilación de ADN y ARN y esto a su vez es camino esencial en la carcinogénesis de al menos 30 cánceres. En este cluster de asociación destacan la WDFY1 que está involucrada en la reacción inflamatoria inducida por citoquinas, la TICAM1 involucrada en la inmunidad innata con-

tra patógenos, la TLR3 componente clave en la inmunidad innata y adaptativa, TBK1 que juega papel esencial en la regulación de la respuesta inflamatoria a agentes extraños, la IRF7 regula la respuesta inmunitaria mediada por interferón, la IL10 que inhibe la síntesis de citoquinas producidas por macrófagos activados y la SERPINA1 que está involucrada en la función de coagulación y la plasmínea^{8,10,11,13}.

ACE2, ACE1, ACACA, HGD, TICAM1, TLR7, ROS1, ACA-CA, XPNPEP2, MEP1B, PRCP, MME, REN, AGTR, AGTR1 y AGTR2, con coeficiente de correlación de 0,54 (Fig. 3), están involucradas en algunos de los síntomas de la COVID-19 como regulación de la presión arterial (nodos verde), respuesta inmunológica, volumen sanguíneo (nodos en azul), regulación de renina-angiotensina (nodos en rojo), reacción de trasplante injerto contra huésped (nodos verde oscuro), apoptosis (nodos amarillo), similares a inmunoglobulinas (nodos magenta)^{12,13}.

Los datos presentados son un informe inicial del análisis y muestra la metodología empleada para llegar al interactoma¹². Cada proteína del interactoma propuesto, tiene según la evaluación in silico que realizamos, un gen con el mismo nombre y tiene la localización exacta en el genoma,¹³ lo que nos impulsa a pensar en una interacción genética, poligénica, importante para las manifestaciones clínicas. Las variantes genéticas que podríamos encontrar sugieren una variante de reacciones y relaciones virus-huésped.

Entre los factores de predisposición a la infección por SARS-COV-2 se han descrito algunos como el grupo sanguíneo, la etnia, el origen humano y la cantidad de genes neandertales, genes de autoinmunidad, HLA, genes de falla cardíaca o renal, entre otros factores^{6,7,8,14,15}. En la búsqueda de genes de predisposición se deben considerar al menos tres grupos: genes con variantes raras, genes con variantes comunes y genes asociados con formas clínicas de la enfermedad^{4,15}, lo que permitiría descifrar los diferentes pasos moleculares que el virus y su patogenicidad producen. La población del Ecuador es trihíbrida¹⁶ y sus componentes europeos, indoamericano y afrodescendientes, con seguridad jugarán un papel en la patogenia y fisiopatología de la COVID-19.

Conclusiones

La siguiente fase del estudio encontrará variantes genéticas específicas a partir del interactoma proteico de los individuos afectados por la COVID-19 de la población ecuatoriana, y asociar el estado de la enfermedad con las variantes genéticas. Lo que esperaríamos es encontrar variantes que protegen a los individuos que serían asintomáticos o con cuadro clínico leve, otras variantes asociadas a sintomatología moderada y al menos un tipo de variantes extras asociadas a la gravedad de la enfermedad o la muerte de los individuos. Aunque el camino a encontrar genes de predisposición es de manera retrograda en el análisis, es decir partiendo de proteínas hacia genes, la ventaja es que las proteínas que hemos encontrado asociadas, tienen genes específicos con su misma nomenclatura y están localizados en el genoma humano, por lo que es legítimo pensar que el interactoma proteico de alguna manera refleja la interacción genética.

Referencias bibliográficas

1. Wang L, Wang Y, Ye D, Liu Q. Review of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) based on current evidence. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2020 Sep 17];55(6):105948. Available from: [/pmc/articles/PMC7156162/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30476243/)

2. Raoult D, Zumla A, Locatelli F, Ippolito G, Kroemer G. Coronavirus infections: Epidemiological, clinical and immunological features and hypotheses. *Cell Stress* [Internet]. 2020 Apr 13 [cited 2020 Sep 17];4(4):66–75. Available from: [/pmc/articles/PMC7064018/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30476243/)
3. LoPresti M, Beck DB, Duggal P, Cummings DAT, Solomon BD. The Role of Host Genetic Factors in Coronavirus Susceptibility: Review of Animal and Systematic Review of Human Literature. Vol. 107, *American Journal of Human Genetics*. Cell Press; 2020. p. 381–402.
4. Paz-Y-Mino C, Morillo SA, Celi AP, Witte T, Guijarro MJM, Colantes JC, et al. CCR5Δ32, CCR2-64I, and SDF1-3 a polymorphisms related to resistance to HIV-1 infection and disease in the Ecuadorian population. *Hum Biol* [Internet]. 2005 [cited 2020 Sep 17];77(4):521–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16485782/>
5. Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes [Internet]. Vol. 94, *Immunology*. 1997 [cited 2020 Sep 17]. Available from: www.pnas.org.
6. Cao Y, Li L, Feng Z, Wan S, Huang P, Sun X, et al. Comparative genetic analysis of the novel coronavirus (2019-nCoV/SARS-CoV-2) receptor ACE2 in different populations. *Cell Discov* [Internet]. 2020;6(1):4–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41421-020-0147-1>
7. Chen J, Jiang Q, Xia X, Liu K, Yu Z, Tao W, et al. Individual variation of the SARS-CoV2 receptor ACE2 gene expression and regulation. 2020;(March):2–5. Available from: www.preprints.org
8. Kruit A, Ruven HJT, Grutters JC, van den Bosch JMM. Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Haplotypes are Associated with PULMONARY DISEASE PHENOTYPES IN SARCOIDOSIS PATIENTS. *Sarcoidosis Vasc Diffus Lung Dis*. 2005;22(3):195–203.
9. Ellinghaus D, Degenhardt F, Bujanda L, Buti M, Albillos A, Invernizzi P, et al. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Jun 17 [cited 2020 Sep 17];NEJMoa2020283. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2020283>
10. Ovsyannikova IG, Haralambieva IH, Crooke SN, Poland GA, Kennedy RB. The role of host genetics in the immune response to SARS CoV 2 and COVID 19 susceptibility and severity. *Immunol Rev* [Internet]. 2020 Jul 13 [cited 2020 Sep 17];296(1):205–19. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/imr.12897>
11. Popov D. The ACE2 Receptor - Factor of Morbidity and Mortality in COVID-19 Epidemic. *EC PULMONOLOGY AND RESPIRATORY MEDICINE*. 2020;4:3–11.
12. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Jung A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Jan 8 [cited 2020 Sep 17];47(D1):D607–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30476243/>
13. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* [Internet]. 2003 Nov 1 [cited 2020 Oct 29];13(11):2498–504. Available from: www.genome.org
14. Mousavizadeh L, Ghasemi S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect*. 2020;(January):19–20.
15. Nguyen A, David JK, Maden SK, Wood MA, Weeder BR, Nellore A, et al. Human Leukocyte Antigen Susceptibility Map for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *J Virol* [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 21];94(13). Available from: <http://jvi.asm.org/>
16. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* [Internet]. 2020;181(2):281–292.e6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>

17. Asselta R, Paraboschi E, Mantovani A, Duga S. ACE2 and TMPRSS2 variants and expression as candidates to sex and country differences in COVID-19 severity in Italy. medRxiv [Internet]. 2020;1–20. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047878>
18. Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020;117(13):7001–3.
19. Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, Djannatian M, Franz J, Kuivanen S, et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. Science [Internet]. 2020 Oct 20 [cited 2020 Oct 30]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33082293>
20. Daly JL, Simonetti B, Klein K, Chen K-E, Williamson MK, Antón-Plágaro C, et al. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. Science (80-) [Internet]. 2020 Oct 20 [cited 2020 Oct 30]; eabd3072. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.abd3072>
21. Milne S, Yang CX, Timens W, Bossé Y, Sin DD. SARS-CoV-2 receptor ACE2 gene expression and RAAS inhibitors [Internet]. Vol. 8, The Lancet Respiratory Medicine. Lancet Publishing Group; 2020 [cited 2020 Oct 30]. p. e50–1. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7220165/>
22. Filardi T, Morano S. COVID-19: is there a link between the course of infection and pharmacological agents in diabetes? [Internet]. Vol. 43, Journal of Endocrinological Investigation. Springer; 2020 [cited 2020 Oct 30]. p. 1053–60. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01318-1>
23. Samavati L, Uhal BD. ACE2, Much More Than Just a Receptor for SARS-CoV-2. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2020 Jun 5 [cited 2020 Oct 30];10:317. Available from: www.frontiersin.org
24. Perrotta F, Matera MG, Cazzola M, Bianco A. Severe respiratory SARS-CoV2 infection: Does ACE2 receptor matter? [Internet]. Vol. 168, Respiratory Medicine. W.B. Saunders Ltd; 2020 [cited 2020 Oct 30]. p. 105996. Available from: [/pmc/articles/PMC7194970/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7194970/?report=abstract)
25. Verdecchia P, Cavallini C, Spanevello A, Angeli F. The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection [Internet]. Vol. 76, European Journal of Internal Medicine. Elsevier B.V.; 2020 [cited 2020 Oct 30]. p. 14–20. Available from: [/pmc/articles/PMC7167588/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7167588/?report=abstract)
26. Bozzo CP, Nchioua R, Volcic M, Wettstein L, Weil T, Krüger J, et al. IFITM proteins promote SARS-CoV-2 infection of human lung cells. bioRxiv [Internet]. 2020 Aug 18 [cited 2020 Oct 30];2020.08.18.255935. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.08.18.255935>
27. Shi G, Kenney AD, Kudryashova E, Zhang L, Hall-Stoodley L, Robinson RT, et al. Opposing activities of IFITM proteins in SARS-CoV-2 infection. bioRxiv [Internet]. [cited 2020 Oct 30]; Available from: [/pmc/articles/PMC7427135/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7427135/?report=abstract)
28. Rebeaud ME, Zores F. SARS-CoV-2 and the Use of Chloroquine as an Antiviral Treatment. Front Med [Internet]. 2020 Apr 24 [cited 2020 Oct 30];7:184. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7193267/>
29. Oscanoa TJ, Romero-Ortuno R, Carvajal A, Savarino A. A pharmacological perspective of chloroquine in SARS-CoV-2 infection: An old drug for the fight against a new coronavirus? Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2020 Oct 30];56(3):106078. Available from: [/pmc/articles/PMC7334645/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7334645/?report=abstract)
30. Hoffmann M, Mösbauer K, Hofmann-Winkler H, Kaul A, Kleine-Weber H, Krüger N, et al. Chloroquine does not inhibit infection of human lung cells with SARS-CoV-2. Nature [Internet]. 2020 Sep 24 [cited 2020 Oct 30];585(7826):588–90. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2575-3>
31. Devaux CA, Rolain JM, Colson P, Raoult D. New insights on the antiviral effects of chloroquine against coronavirus: what to expect for COVID-19? Int J Antimicrob Agents. 2020 May 1;55(5):105938.
32. Heiser+1 K, Mclean+1 PF, Davis+1 CT, Fogelson1 B, Gordon1 HB, Jacobson1 P, et al. Title: Identification of potential treatments for COVID-19 through artificial intelligence-enabled phenomic analysis of human cells infected with SARS-CoV-2. [cited 2020 Oct 30]; Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.04.21.054387>
33. Palese LL. The Structural Landscape of SARS-CoV-2 Main Protease: Hints for Inhibitor Search. [cited 2020 Oct 30]; Available from: <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12209744.v1>
34. Kim JC, Spence RA, Currier PF, Lu X, Denison MR. Coronavirus protein processing and RNA synthesis is inhibited by the cysteine proteinase inhibitor E64d. Virology [Internet]. 1995 Apr 1 [cited 2020 Oct 30];208(1):1–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11831690/>
35. Hoffmann M, Hofmann-Winkler H, Smith JC, Krüger N, Sørensen LK, Søgaard OS, et al. Camostat mesylate inhibits SARS-CoV-2 activation by TMPRSS2-related proteases and its metabolite GBPA exerts antiviral activity. bioRxiv Prepr Serv Biol [Internet]. 2020 Aug 5 [cited 2020 Oct 30]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32793911>
36. Uno Y. Camostat mesilate therapy for COVID-19 [Internet]. Internal and Emergency Medicine. Springer; 2020 [cited 2020 Oct 30]. p. 1. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7188520/>
37. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Mü MA, Drosten C, Pö S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. Cell [Internet]. 2020 [cited 2020 Oct 30];181:271–280.e8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
38. Cui C, Huang C, Zhou W, Ji X, Zhang F, Wang L, et al. AGTR2, one possible novel key gene for the entry of 2019-nCoV into human cells. Preprints. 2020;19(April):1–37.
39. Tas SK, Kirkik D, İşik ME, Kalkanlı N, Uzunoglu AS, Uzunoglu MS, et al. Role of ACE2 Gene Expression in Renin Angiotensin System and Its Importance in Covid-19: In Silico Approach. Brazilian Arch Biol Technol [Internet]. 2020 [cited 2020 Oct 30];63:2020. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132020000100333&tIng=en
40. Zolfaghari Emameh R, Falak R, Bahreini E. Application of System Biology to Explore the Association of Nephrylysin, Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2), and Carbonic Anhydrase (CA) in Pathogenesis of SARS-CoV-2. Biol Proced Online [Internet]. 2020 Jun 19 [cited 2020 Oct 30];22(1):1–9. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s12575-020-00124-6>
41. Goothy SSK, Kumar AH. Network Proteins of Angiotensin-converting Enzyme 2 But Not Angiotensin-converting Enzyme 2 itself are Host Cell Receptors for SARS-Coronavirus-2 Attachment. Biol Eng Med Sci Reports. 2020 May 20;6(1):1–5.

Received: 9 noviembre 2020

Accepted: 10 enero 2021

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Caracterización química y nutricional de harina de chañar de diferente distribución geográfica

Chemical and nutritional characterization of chañar flour from different geographical distribution

J.I. Maschio¹, P. Boeri², D. Dalzotto², L. Piñuel^{2*}, S. Sharry³

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.18

Resumen: El chañar (*Geoffroea decorticans*) es una planta nativa que se distribuye en regiones áridas y semiáridas de sudamérica, cuyos frutos constituyen un recurso alimenticio para las comunidades rurales y originarias. El conocimiento sobre la biodiversidad no solo permite poner en valor estas especies, sino también generar alternativas de uso y consumo de nuevos recursos bio-basados. Los metabolitos secundarios constituyen una fuente importante de aditivos alimenticios, productos farmacéuticos e industriales cuya síntesis y composición está influenciada por las características ambientales de donde crecen las plantas. Dada a su amplia distribución geográfica, la caracterización fitoquímica de los frutos de chañar podría presentar diferencias de acuerdo a su procedencia. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la composición química y nutricional de los frutos de *G. decorticans* procedente de dos ecorregiones argentinas: el Chaco árido y Monte Oriental o de transición. Se determinó la composición nutricional de harinas integrales de ambas procedencias y se evaluó el contenido total de polifenoles (CTP), de antocianinas y la actividad antioxidante *in vitro*, tanto de harinas integrales como de harinas de mesocarpio. La composición nutricional no presentó diferencias significativas entre las muestras evaluadas. El CTP varió entre 87-124 mg GAE/100g de harina base seca, y fue mayor en los extractos de las harinas integrales. El contenido de antocianinas en las muestras de Río Negro fue un 70% mayor que en las de Catamarca. Los extractos de harina de mesocarpio de Río Negro presentaron un 20% menos de CTP que de las de Catamarca, sin embargo, la actividad antioxidante obtenida por ABTS fue comparable entre ellas. En conclusión, los resultados sugieren que la harina integral de *G. decorticans* podría utilizarse como una fuente de antioxidantes naturales de uso alimentario.

1563

Palabras clave: *Geoffroea decorticans*, actividad antioxidante, antocianinas, polifenoles, Chaco Árido, Monte Oriental.

Abstract: The chañar (*Geoffroea decorticans*) is a native plant that is distributed in arid and semi-arid regions of South America, whose fruits constitute a food resource for rural and native communities. The knowledge about biodiversity not only allows us to value these species, but also to generate alternatives for the use and consumption of new bio-based resources. Secondary metabolites constitute an important source of food additives, pharmaceutical and industrial products whose synthesis and composition is influenced by the environmental characteristics of where the plants grow. Given its wide geographical distribution, the phytochemical characterization of the Chañar fruits could present differences according to their origin. Therefore, the aim of this work was to study the chemical and nutritional composition of *Geoffroea decorticans* fruits from two Argentinean ecoregions: the Arid Chaco and Oriental Monte or Transitional Monte. It was determined the nutritional composition of integral flours from both origins and the total polyphenols content (TPC), anthocyanins and the *in vitro* antioxidant activity, both of integral and mesocarp flours were evaluated. The nutritional composition did not present significant differences between the samples. However, the TPC varied between 87-124 mg GAE/100g of dry flour, and was higher in the extracts of integral flours. Anthocyanin content in Río Negro samples was 70% higher than in Catamarca samples. Río Negro's mesocarp flour extracts presented 20% less TPC than those from Catamarca, however, the antioxidant activity obtained by ABTS was comparable between them. In conclusion, the results suggest that the integral flour of *G. decorticans* could be used as a source of natural antioxidants for food use.

Key words: *Geoffroea decorticans*, antioxidant activity, anthocyanins, polyphenols, Arid Chaco, Oriental Monte, Transitional Monte.

Introducción

El chañar, *Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook. et Arn.) Burkart, es una especie arbórea nativa de regiones áridas y semiáridas de Sudamérica y en Argentina, se encuentra presente desde el extremo septentrional del país (provincias de Jujuy, Salta y Formosa) hasta norte de la Patagonia (provincia de Río Negro). Esta especie posee frutos drupáceos, ovoides o globosos, pardo-rojizo a la madurez¹ los cuales presentan diversas formas de uso y consumo como recurso alimenticio y medicinal². Actualmente los frutos del chañar son una fuente de materias primas que permiten a las poblaciones rurales y

comunidades originarias satisfacer sus necesidades cotidianas, como el tratamiento de afecciones de la salud, alimentación, provisión de forrajes y energía, entre otras³⁻⁵, de esta manera, las especies nativas constituyen recursos alimenticios que pueden potenciar el desarrollo de las economías regionales. En este sentido, resulta indispensable profundizar el conocimiento sobre estas, especialmente cuando se trata de especies de ambientes áridos y semiáridos, que presentan una mejor adaptación ante el futuro escenario de cambio climático global. Por otra parte, existe un creciente interés por conocer

¹ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Catamarca, Catamarca, Argentina.

² Universidad Nacional de Río Negro, Sede Atlántica, Viedma, Argentina.

³ Laboratorio de Investigaciones en Maderas (LIMAD), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, La Plata- Universidad Nacional de Río Negro, Sede Atlántica, Viedma, Argentina.

los recursos silvestres regionales y su valor nutricional, con el objeto de buscar nuevos alimentos para el consumo humano y garantizar la soberanía alimentaria, particularmente en las regiones rurales⁶. Así, la caracterización fitoquímica de *G. decorticans* se ha llevado a cabo por diversos autores, pero siempre basándose en individuos de una población específica. Dada la amplia distribución geográfica de esta especie se plantea el interrogante de si existen cambios de índole morfológico, genético y químico ya que crece bajo condiciones climáticas y edáficas disímiles⁷. En este sentido, Akula & Ravishankar, indicaron que la síntesis y acumulación de metabolitos suele producirse en plantas sometidas a factores de estrés que incluyen diversos elicitores⁸. Los metabolitos secundarios, como los compuestos fenólicos, desempeñan un papel importante en la adaptación de las plantas al medio ambiente y en la supervivencia bajo condiciones de estrés. Los factores ambientales como la altitud, la temperatura, la humedad, la intensidad de la luz, los minerales, entre otros, influyen tanto en el crecimiento de la planta como en la producción de metabolitos secundarios⁸. Los polifenoles son compuestos bioactivos presentes en los alimentos que le confieren diferentes propiedades funcionales y contribuyen con la actividad antioxidante de los mismos. Dentro de esa caracterización fitoquímica del chañar, el análisis de polifenoles como fuente de antioxidantes de origen natural cobra mayor importancia al tratarse de una especie de amplia distribución, que podría impactar tanto en las economías rurales donde naturalmente se consume como fuera de estos entornos. El objetivo de este trabajo fue determinar la composición nutricional y evaluar las propiedades antioxidantes de diferentes fracciones del fruto de chañar procedentes de dos ecorregiones argentinas.

Materiales y métodos

Material vegetal y preparación de las muestras

Los frutos maduros de *Geoffroea decorticans* fueron colectados durante noviembre 2018 y enero 2019, a partir de 20 individuos seleccionados al azar sobre la base de su óptimo estado fitosanitario. La colecta se realizó en dos ecorregiones de Argentina, habiendo incluido el límite de distribución más austral definido para esta especie (Provincia de Río Negro). Los sitios de muestreo fueron: Departamento Capital de la Provincia de Catamarca (28°27'26.21"S; 65°46'59.65"O), correspondiente a la Ecorregión de Chaco Árido y Departamento Adolfo Alsina

de la provincia de Río Negro (41°1'15.24"S; 62°49'10.31"O), ecorregión de Monte Oriental o de Transición⁹. A fin de caracterizar la materia prima utilizada por las poblaciones rurales en diferentes preparaciones culinarias, se obtuvieron dos tipos de harinas. En una de ellas, se incluyó el mesocarpio y pericarpio (en adelante, harina de mesocarpio) y en otra los frutos completos y semillas (en adelante, harina integral) (Figura 1). Se obtuvieron, entonces, las siguientes muestras: a) harina integral de Catamarca (IC); b) harina de mesocarpio de Catamarca (MC); harina integral Río Negro (IRN); y harina de mesocarpio de Río Negro (MRN). Para la obtención de estas harinas, los frutos completos fueron secados en estufa eléctrica SanJor modelo SL70C a $55 \pm 2^\circ\text{C}$, hasta alcanzar peso constante. Luego los frutos con y sin semilla fueron molidos, en molino de cuchillo y tamizados manualmente (500 micrones) para obtener una harina homogénea. Las diferentes muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso en las determinaciones químicas correspondientes.

Evaluación de los componentes de interés nutricional de las harinas de *G decorticans*

Por su simplicidad, la materia prima más frecuentemente utilizada en preparaciones culinarias es la harina integral, es decir, aquella que se obtiene a partir de los frutos completos. Por ello, las muestras caracterizadas nutricionalmente fueron las harinas integrales de Catamarca (IC) y de Río Negro (IRN).

Composición química

La determinación del contenido de humedad, hidratos de carbono, fibra dietaria, proteínas, lípidos y cenizas se realizó de acuerdo con la metodología especificada por la AOAC¹⁰ y todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

Determinación de humedad

Para determinar el contenido de humedad, se utilizaron 20 g de harina integral de las diferentes localidades. La humedad se determinó por diferencia de peso antes y después de secar la muestra a 55°C en estufa eléctrica SanJor modelo SL70C, hasta alcanzar un peso constante.

Hidratos de Carbono

El contenido de carbohidratos se calculó por diferencia a través del método utilizado por Rodríguez y Zuluaga¹¹. Este método, consiste en restar a 100, la sumatoria de los porcentajes de humedad, proteína, lípidos y cenizas.



Figura 1. Separación de mesocarpio y pericarpio de la semilla, para la obtención de diferentes harinas. a) Semillas, b) mesocarpio y pericarpio, c) fruto completo de *G. decorticans*.

Proteína total

El contenido proteico de las muestras se determinó mediante el método Kjeldahl. El cálculo de proteína se realizó a partir de los datos de nitrógeno obtenidos de la muestra, aplicando el factor de conversión 6,25.

Lípidos

Para la cuantificación de lípidos se usó el método de Soxhlet en el cual se pesó 5 gramos de harina y se utilizó éter de petróleo, como solvente de extracción. Las muestras fueron calentadas durante 2 h y el balón donde se extrajeron los lípidos se secó en estufa a 60°C. El contenido de aceite se determinó por diferencia de peso.

Cenizas

Brevemente, se pesó 4 gramos de cada una de las muestras y se calcinaron. En primer lugar, cada muestra se quemó con un mechero bajo campana hasta que no se desprendieran humos. Posteriormente se introdujo a la mufla 2 h, a 550 °C y se obtuvieron cenizas blancas o ligeramente grises y homogéneas. Por último, las muestras se enfriaron en desecador y se pesaron.

Estimación del aporte calórico

El aporte calórico se determinó de acuerdo a la ecuación descrita por Indrayan *et al.*¹², donde los lípidos aportan 9 Kcal/g y los carbohidratos y proteínas 4 Kcal/g.

Extracción de polifenoles

En este caso, se evaluó el contenido de polifenoles totales en cuatro muestras diferentes: a) harina integral de Catamarca (IC); b) harina de mesocarpio Catamarca (MC); c) harina integral Río Negro (IRN); y d) harina de mesocarpio Río Negro (MRN).

La extracción de polifenoles en cada muestra, se llevó a cabo en reflujo a ebullición en 3 etapas de extracción de 30 minutos cada una con una solución metanólica 70% v/v en una proporción 1:3 p/v. Las tres fracciones se unificaron en una única muestra y el solvente fue evaporado y recuperado a través de un evaporador rotatorio (RE100-PRO DragonLab) a 60°C durante 30 min. La solución acuosa final fue liofilizada, para la estimación del rendimiento.

Cuantificación de polifenoles totales

El contenido total de polifenoles (CTP) se cuantificó mediante el método colorimétrico Folin-Ciocalteu¹³ y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de peso seco de harina.

Cuantificación de las antocianinas

El contenido total de antocianinas -expresado en mg de equivalentes de cianidina-3-glucósidos (C3GE) por 100 g de peso seco- se evaluó por el método de diferencial de pH¹⁴.

Determinación de la actividad antioxidante

Se determinó la capacidad de capturar radicales libres

de los extractos metanólicos de IC, MC, IRN y MRN. Para la medición de esta actividad se utilizaron los métodos DPPH y ABTS¹⁵⁻¹⁷. El patrón de referencia utilizado fue Trolox (0-0,95 mM de curva de calibración). La curva estándar obtenida para DPPH fue $Y = -0.4594x + 0.5033$, $R^2 = 0,999$; y la curva estándar para ABTS fue $Y = -0.1249x + 0.171$, $R^2 = 0,985$.

Análisis estadístico

Todas las determinaciones realizadas fueron realizadas por triplicado, y los resultados se calcularon sobre base seca, expresándose como promedio y desviación estándar.

Resultados y discusión

Macronutrientes de harinas integrales de *G. decorticans*

La determinación del valor nutricional de los frutos de chañar cobra especial importancia dado que éstos son comúnmente consumidos por los pobladores de Argentina en diversas preparaciones. Si bien existe información de frutos procedentes del norte argentino^{3,4}, la información sobre esta especie en su límite de distribución más austral (Norpatagonia Argentina), es aún escasa. En la tabla 1, se muestran los resultados obtenidos de la composición nutricional de las harinas integrales de chañar de Catamarca y de Río Negro. A partir de la composición centesimal se pudo estimar el valor nutricional de estas harinas y se obtuvo que la harina proveniente de Catamarca tiene un valor nutritivo de 380.3 Cal/100 g y la harina de Río Negro 391.35 Cal/100 g. La diferencia observada en el valor nutricional, se basa principalmente en el contenido de lípidos, el cual es 1.7 veces mayor en los frutos de Río Negro. No obstante, estos valores, se encuentran en el mismo orden que los descritos en la bibliografía³. Indrayan *et al.*¹² analizaron el beneficio nutricional de los recursos vegetales comestibles y clasificaron a las plantas en categorías de alimentos, forraje y/o usos medicinales. Según esta clasificación, los valores nutricionales obtenidos a partir de la harina de *G. decorticans* la presenta entonces, como una fuente alternativa de alimentos.

El contenido de agua de los frutos fue bajo (<10%) y estable en ambas muestras, sin presentar diferencias estadísticamente significativas. Dado que esta característica impacta en la conservación y la estabilidad microbiológica de los frutos, es recomendable que los valores de humedad en harinas no superen el 15%, especialmente para su aplicación en la elaboración de panificados. Con respecto a la composición centesimal, los carbohidratos representan el principal componente de ambas muestras (>80%). Resultados similares fueron informados para la especie por Orrabalis *et al.*¹⁸, quienes describieron a este fruto como altamente energético. Por otra parte, el contenido de ceniza es un indicativo de la calidad de la muestra en estudio, dado que constituye la base para evaluar su pureza. Los valores de ceniza obtenidos en las dos muestras analizadas reflejan un buen aporte de materia inorgánica, siendo incluso superiores a los obtenidos en otras harinas de uso frecuente en el sector alimenticio, como la de trigo (0.98%) y de otra leguminosa como el algarrobo (1.80-2.19%)^{19,20}. Respecto

Origen de las muestras	Humedad	Proteínas	Lípidos	Carbohidratos	Cenizas
Catamarca	6.8±0.23	5.4 ±0.17	3.6±0.82	84.9 ±5.67	2.7±0.2
Río Negro	7±0.18	5.9±0.31	6.1±0.13	81.6±5.23	2.9±0.13

Tabla 1. Composición centesimal, expresada en g/100g peso seco (PS), de la harina integral del fruto de chañar (*G. decorticans*).

del contenido de proteína total de frutos provenientes de ambas regiones se observaron valores del mismo orden que lo descrito por Costamagna *et al.*²¹ para frutos de esta especie, lo cual indica que este parámetro no fue influenciado por las condiciones ambientales. Cabe destacar que, a excepción del contenido de lípidos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las harinas integrales de distinta procedencia.

Contenido de fitocompuestos en harinas de *G. decorticans*

Los polifenoles son componentes bioactivos presentes en alimentos de origen vegetal, que le confieren diferentes propiedades funcionales y contribuyen con la actividad antioxidante de los mismos. Además, estos compuestos pueden ser incorporados mediante el consumo de una dieta enriquecida con polifenoles, como complementos alimenticios o como formulaciones en fármacos/nutracéutico²². El rendimiento alcanzado en la obtención de polifenoles depende del método de extracción utilizado, en este trabajo, fue de 1.91 y 3.54 % para extractos de harina integral de Catamarca y de Río Negro, respectivamente. En la figura 2 se observa el contenido total de polifenoles (CTP) de los extractos metanólicos de *G. decorticans*, de ambas procedencias y en diferentes tipos de harinas. El CTP promedio de las cuatro muestras evaluadas varió entre 87-124 mg GAE/100 g de harina base seca y fue mayor en los extractos de las harinas integrales, respecto de las de mesocarpio. Además, se encontraron diferencias significativas en el CTP entre las muestras de diferentes procedencias. El CTP observado en las de Catamarca fue aproximadamente un 20% superior a las de Río Negro. Dado que el rendimiento obtenido en las muestras de Río Negro fue mayor que el obtenido en harinas de Catamarca y que éste no se corresponde con el CTP, se podría inferir que el método de extracción utilizado favoreció la solubilización de otros compuestos asociados a los polifenoles como carbohidratos, lípidos y proteínas. Además, las diferencias observadas en el CTP de las muestras de diferente procedencia podrían deberse a las condiciones ambientales presentes en cada sitio de muestreo. En este sentido, ha sido informado que la síntesis de compuestos fenólicos podría estar influenciada por las condiciones climáticas, de suelo e incluso la altitud propia de las dos ecorregiones evaluadas²³.

Rufino *et al.*²⁴ clasificaron los frutos de acuerdo a su CTP en materia seca en tres categorías: bajo (<100 mg GAE/100 g), medio (100-500 mg GAE/100 g) y alto (>500 mg GAE/100 g). De acuerdo a esta clasificación, las harinas de *G. decorticans* evaluadas en este trabajo podrían ser consideradas de categoría media, no obstante, el resultado obtenido por Costamagna *et al.*²¹ con el mismo medio de extracción, clasificó a los frutos evaluados como altos en CTP.

Contenido de antocianinas

Las antocianinas son compuestos bioactivos del tipo flavonoides que están presentes en la nutrición humana a través de alimentos de origen vegetal. Debido a sus propiedades antioxidantes, se reportan en la literatura varios beneficios para la salud relacionados con su consumo²⁵.

El contenido de antocianinas de los extractos metanólicos obtenidos de harina integral mostraron diferencias significativas entre las muestras de Catamarca y de Río Negro, con valores de 0.95 ± 0.08 y 1.62 ± 0.08 g C3GE/100g de harina, respectivamente. El contenido de antocianinas en las muestras de Río Negro fue un 70% mayor que en las de Catamarca. Esto podría deberse a que las antocianinas proporcionan protección ante efectos de la temperatura, UV, patógenos, tipos de suelo, entre otros²⁶. Así, la síntesis de estos compuestos está directamente influenciada por estos factores externos e incide sobre la coloración de los frutos como puede observarse en la figura 3 a y b.

Actividad antioxidante de extractos enriquecidos con polifenoles de harina de Chañar

Los compuestos fenólicos están presentes en muchos alimentos de origen vegetal y debido a su poder antioxidante y antiinflamatorio, se los asocia con beneficios para la salud. Por ello, estos compuestos han sido evaluados para la prevención de enfermedades cardiovasculares, aumento de las defensas naturales adaptativas del organismo, modulación de varios mecanismos patológicos involucrados en neurodegeneración, entre otros²⁷.

Los extractos metanólicos enriquecidos con polifenoles de las harinas de chañar exhibieron capacidad antioxidante *in vitro*, determinados por los métodos de ABTS y DPPH (figura

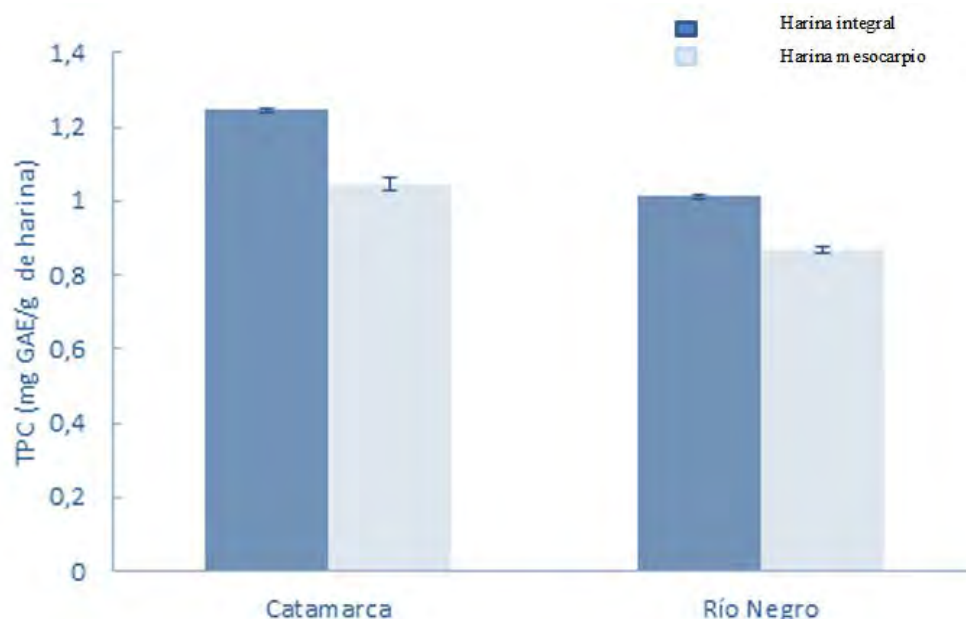


Figura 2. Contenido total de polifenoles (TPC) de extractos metanólicos obtenidos de diferentes harinas.

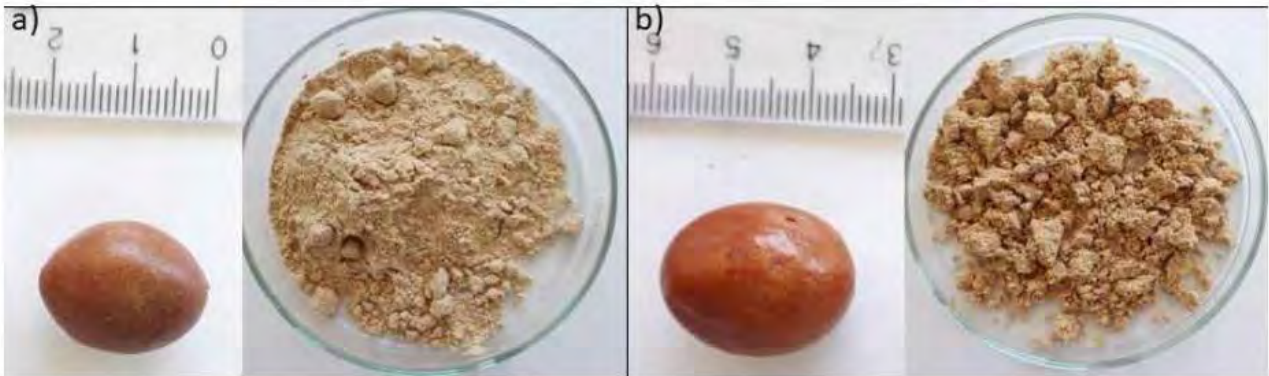


Figura 3. Morfología externa del fruto y harina integral de *G. decorticans* a) procedente de la ecorregión Chaco Árido (Pcia de Catamarca) b) procedente de la ecorregión de Monte Oriental o de transición (Pcia Río Negro).

4). Como se puede observar, cuando se utilizó el método de DPPH no se observaron diferencias significativas entre los extractos evaluados y se determinaron valores de actividad 0.15-0.35 mmoles Eq. de trolox/g de extracto. Sin embargo, con el método de ABTS la harina de integral de Río Negro presentó una actividad 2 veces menor respecto a los demás extractos evaluados.

Como se ha informado en varias oportunidades, un mayor CTP no siempre se corresponde con una alta actividad antioxidante²⁷. En este sentido, los extractos de harina de mesocarpio de Río Negro presentaron un 20% menos de CTP, sin embargo, su actividad antioxidante fue comparable con la observada en los extractos de Catamarca. Por otra parte, la menor actividad antioxidante obtenida en el extracto de la harina integral de Río Negro (IRN) podría relacionarse con el mayor rendimiento obtenido en la extracción (3.54%) que podrían incluir otras moléculas. Además, el contenido de lípidos determinados para esta muestra (IRN) fue 1.7 veces superior al resto, la presencia de estas moléculas podría afectar la actividad antioxidante. Sin embargo, la interacción de estos metabolitos con los polifenoles podría protegerlos de la oxidación durante su paso por el tracto gastrointestinal y favorecer así su absorción²⁸.

Conclusiones

La similitud obtenida en la caracterización nutricional de los frutos del chañar de diferente procedencia es un indicio de la estabilidad que poseen los metabolitos primarios ante los cambios ambientales. Sin embargo, este trabajo evidenció que el CTP presentó diferencias significativas entre los extractos obtenidos de frutos de distintas ecorregiones. Esto confirma que la síntesis de metabolitos secundarios está directamente relacionada con los factores externos a los que se encuentra sometida la planta, como la altitud, latitud, tipos de suelo, estrés, entre otros.

Por otra parte, los valores de actividad antioxidante variaron según el tipo de muestra utilizada. En particular, el contenido de lípidos presentes en la harina integral de Río Negro pudo haber enmascarado la actividad asociada a los compuestos polifenólicos e impactar así su bioaccesibilidad y biodisponibilidad.

En conclusión, este trabajo permite proponer el uso de harinas integrales de frutos del chañar como una fuente alternativa natural para su uso alimenticio.

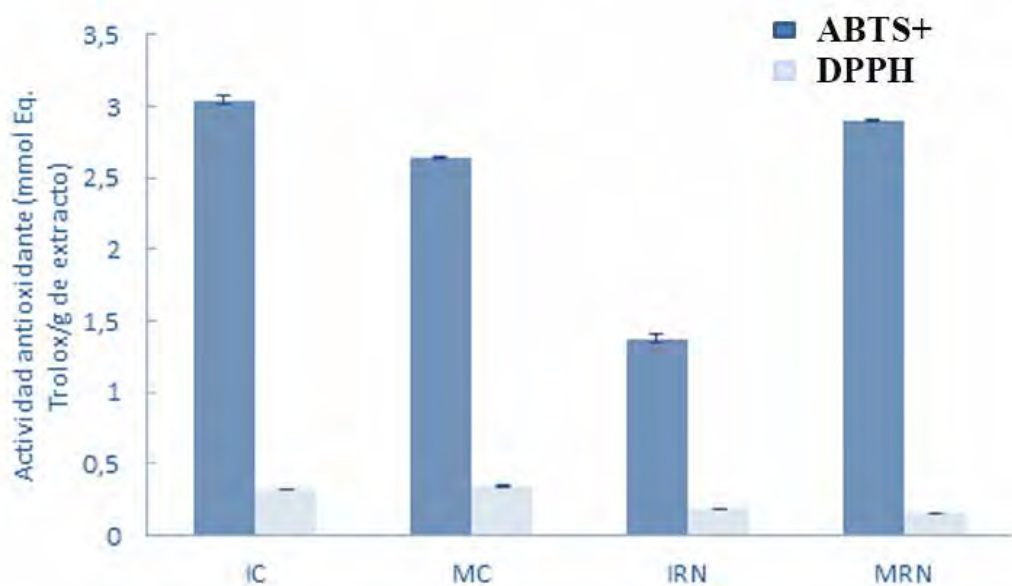


Figura 4. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de las diferentes harinas por el método de ABTS+ y DPPH. IC (harina integral de Catamarca); FC (harina de mesocarpio de Catamarca); IRN (harina integral de Río Negro); FRN (harina de mesocarpio de Río Negro).

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo de BIOALI-CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo) por su apoyo a la investigación científica y fortalecer las colaboraciones internacionales exitosas.

Referencias bibliográficas

- Burkart A (1949). La posición sistemática del "chañar" y las especies del género *Geoffroea* (Leguminosae-Dalbergieae). *Darwiniana*, 9: 9-23.
- Costamagna MS, Zampini IC, Alberto MR, Cuello S, Torres S, Pérez J, Quispe C, Schmeda-Hirschmann G, Isla MI (2016). Polyphenols rich fraction from *Geoffroea decorticans* fruits flour affects key enzymes involved in metabolic syndrome, oxidative stress and inflammatory process. *Food Chemistry*, 190: 392-402.
- Orrabalis CJ (2014). Aprovechamiento integral de los frutos de *Geoffroea decorticans* (Chañar) de la Región Fitogeográfica de la provincia de Formosa. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina; 165 pp.
- Arena P, Scarpa G (2007). Edible wild plants of the Chorote Indians, Gran Chaco, Argentina. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 153: 73-85.
- Silva S (1988). *Prosopis juliflora* (Sw) DC in Brazil. En: Habit M. (ed). The current state of the knowledge on *Prosopis juliflora*. FAO, Roma, 29-55.
- Figueiredo G, Leitão-Filho F, Begossi A (1993). Ethnobotany of atlantic forest coastal communities: diversity of plant uses in Gamboa (Itacuruça Island, Brazil). *Human Ecology*, 21: 419-430.
- Dellacassa E (2010). Normalización de productos Naturales Obtenidos de Especies de la Flora Aromática Latinoamericana. Ed. Universitária da PUCRS, Porto Alegre, Brasil; 337 pp.
- Akula, R., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11): 1720-1731.
- Oyarzabal M, Clavijo M, Oakley L, Biganzoli F, Tognetti P, Barberis I, Maturo HM, Aragón R, Campanello PI, Prado D, Oesterheld M, León RJC (2018). Unidades de Vegetación de la Argentina. *Ecología Austral*, 28: 40-63.
- Association of Official Analytical Chemists International (AOAC) (1990). *Official Methods of Analysis*, 15th edn (edited by K. Helrich) Pp. 1028-1039. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists Inc.
- Rodríguez N, Zuluaga J (1994). Cultivo de *Pluerotus pulmonarius* en la pulpa de café. *Cenicafe*, 45(3):81.
- Indrayan AK, Sharma S, Durgapal D, Kumar N, Kumar M (2005). Determination of nutritive value and analysis of mineral elements for some medicinally valued plants from Uttaranchal. *Current Science*, 1252-1255.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology Academic Press*, Vol 299: 152-178.
- Lee J, Durst RW, Wrolstad RE (2005). Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *J AOAC Int* 88(5): 1269-78.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 20: 25-30.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 9/10, 1231-1237.
- Kuskoski E, Asuero A, Troncoso A, Mancini-Filho J, Fett R (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Journal of Food Science and Technology*, 25(4): 726-732.
- Orrabalis CJ, Gorostegui H, Calandri E, Guzmán C (2013). Parámetros funcionales y contenido de glucosa en harinas obtenidas de fruto maduro de "chañar" (*Geoffroea decorticans*) de la zona semiárida y árida de la provincia de Formosa. *Multiequina*, vol. 22, 2013.
- Loconi M, Silva E (2014). Determinación de los parámetros de dilución y tiempo de fermentación para obtener una bebida alcohólica utilizando harina de algarroba (*Prosopis pallida*). Tesis de grado. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Recuperado de: <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/UNPRG/149>
- Alamo Farroñan MR (2019). Caracterización fisicoquímica de la harina de algarroba (*Prosopis pallida*) del distrito de Illimo. Tesis de grado, Facultad de Ingeniería Arquitectura y Urbanismo, Universidad Señor del Sipán. Perú; 51 pp.
- Costamagna MS, Ordóñez RM, Zampini IC, Sayago JE, Isla MI (2013). Nutritional and antioxidant properties of *Geoffroea decorticans*, an Argentinean fruit, and derived products (flour, arropo, decoction and hydroalcoholic beverage). *Food Research International*, 54(1): 160-168.
- Silva RFM, Pogačnik L (2020). Polifenoles de alimentos y productos naturales: neuroprotección y seguridad. *Antioxidants*, 9: 61.
- Marakis S, Lambraki M, Diamantoglou S (1993). Química de taninos de nueve variedades de algarrobo de Creta. *Chimica Chronica*, 22: 213-224.
- Rufino MDS, Pérez Jiménez J, Taberner M, Alves RE, De Brito ES, Saura Calixto F (2010). Acerola and cashew apple as sources of antioxidants and dietary fibre. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(11): 2227-2233.
- Tarone AG, Cazarin CBB, Junior MRM (2020). Antocianinas: nuevas técnicas y desafíos en microencapsulación. *Food Research International*, 133: 109092.
- Esteban MA, Villanueva MJ, Lissarrague JR (2001). Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science (JTAFS)*, 81(4): 409-420.
- Yang CM, Lee CN, Chou CH (2002). Effects of Three Allelopathic Phenolics on Chlorophyll Accumulation of Rice (*Oryza sativa*) Seedlings: I. Inhibition of Supply-Oriented. *Botanical Bulletin-Academia Sinica Taipei (Taiwan)*, 43: 299-304.
- Jakobek L (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175: 556-567.

Received: 17 diciembre 2020

Accepted: 26 enero 2021

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Pathogenicity of *Moniliophthora roreri* isolates from selected morphology groups in harvested cacao pods and *in vitro* sensitivity to compost teaMaría Gabriela Maridueña-Zavala¹, María Isabel Jiménez Feijoo², Juan Manuel Cevallos-Cevallos^{1,2} DOI. [10.21931/RB/2021.06.01.19](https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.01.19)

Abstract: *Moniliophthora roreri* is the frosty pod rot disease (FPD) and one of the most devastating cacao pathogens worldwide. However, *M. roreri* pathogenicity on harvested cacao pods and sensitivity to compost tea have not been fully described. Monosporic cultures of *M. roreri* from different morphology groups were obtained. The isolates' pathogenicity was tested by inoculation onto harvested cacao pods, and symptoms were evaluated at 3-day intervals during 16 days before estimating the area under the disease progress curve (AUDPC). The sensitivity of *M. roreri* to compost tea was evaluated on potato dextrose agar (PDA) amended with 1 to 5 % compost tea. All morphology groups could infect harvested cacao pods during the 16 days with a disease severity index above 75 %. Compost tea completely inhibited the growth of *M. roreri* when used at 4.5 % or higher. Results suggest a shortened biotrophic phase during the infection in harvested pods and a medium to high sensitivity of *M. roreri* to compost tea.

Key words: Moniliasis, cacao national, biol, biotrophic, necrotrophic.

1569

Introduction

Cacao (*Theobroma cacao*) trees are usually categorized as "fine flavor" or "bulk/ordinary" depending on the aroma released by the fermented beans¹. Ecuador is the top delicate flavor cacao producer worldwide² with extensive production areas for the 'Nacional' and 'CCN51' types of cacaos. The Nacional cacao is preferred by consumers³ but is more susceptible to the frosty pod rot disease (FPD) than CCN51⁴. The FPD has caused significant losses in the cacao production of Latin American countries¹, and the production of Nacional cacao is partially being replaced by CCN51 in Ecuador⁴ mostly because of FPD.

Moniliophthora roreri—the causal agent of FPD—has been classified into 14 morphology groups, and various characteristics, including growth rate and genetic patterns of each group, were recently described⁵. To cause the disease, the pathogen infects plant-attached cacao pods and undergoes a biotrophic phase of up to 3 months before causing necrosis and spore masses over the pod's surface⁶. During the biotrophic phase, the pod is usually symptomless but, in some cases, may develop malformations before entering the necrotrophic phase^{6,7}. The pathogenicity of *M. roreri* strains from different origins has been assessed in plant-attached pods of various cultivars in which the necrosis was evidenced⁸.

In addition to plant-attached pods, various diseases, including *Phytophthora* Pod Rot^{9,10} and *Botryodiplodia theobromae* rot¹¹ can affect harvested cacao pods causing pod damage while becoming an inoculum source for spreading the disease. However, the pathogenicity of *M. roreri* from the different morphology groups has not been evaluated on harvested cacao pods.

In Ecuador, a significant proportion (about 7600 ha in 2007) of the cacao production is organic^{12,13}, and fungicides or other chemicals cannot be applied in the fields. As an alternative, the use of biological control agents¹⁴ and the application of compost teas¹⁵ have been proposed to control plant pathogens in organic plantations. Compost teas are usually obtained through fermentation of agricultural waste and effectively control several plant pathogens, including *M. roreri*¹⁶. However, the sensitivity to compost teas of *M. roreri* isolates belong-

ing to the different morphology groups has not been reported.

This research aimed to assess harvested cacao pods' pathogenicity and the sensitivity to compost tea of *M. roreri* isolates from selected morphology groups.

Materials and methods

Isolation and classification of *M. Roreri*.

Isolates of *M. Roreri* were obtained as indicated in previous reports⁵. Briefly, mature cacao pods showing FPD symptoms, including pod lesions with white to creamy mycelium, and internal pod tissues showing necrosis¹⁷, were collected from plantations located on Ecuador's coast. Healthy pods were also randomly collected and analyzed as controls. Sampled pods that showed symptoms of other diseases were not considered for this study.

Sampled pods were cut into small sections and placed onto MEA (malt extract agar, Oxoid) and incubated at 27°C for 48 h to allow the growth of *M. roreri*. Mycelia were then transferred to fresh MEA plates and incubated at 27°C for 7 days. Meiospores formed on the MEA media were then mixed in water (10⁶ meiospores/mL), and 10 µL of the mix were transferred to WA (water agar, Oxoid) and incubated at 27°C for 24 to 48 h. Using a stereomicroscope, germinated meiospores were selected and transferred to MEA plates followed by incubation at 27°C for 20 days. Mycelia samples were then transferred to MEA and incubated at 27°C for 15 days. The identity of each isolate was confirmed by PCR amplification and sequencing of the ITS region. All of the obtained isolates were classified into one of the 14 morphology groups defined in previous reports⁵ using the classification scale shown in Table 1.

Pathogenicity assessment

Pathogenicity tests were conducted on harvested pods using the dry conidia method¹⁸. Briefly, *M. roreri* meiospores were attached to a pin's head and deposited onto a two square centimeters area of a cocoa pod previously marked and moistened

¹ Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), Guayaquil, Ecuador.

² Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias de la Vida (CIBE), Guayaquil, Ecuador.

Morphology group	PDA colony description	Isolates obtained
1	Cream-salmon only	11
2	Intercalated Dark brown and cream-salmon	11
3	Cream-salmon to light brown to white	6
4	Dark brown to light brown to white	3
5	Dark brown to cream-salmon to white	9
6	Dark brown to cream-salmon	8
7	Dark brown only	7
8	Light brown to white	2
9	Cream-salmon to white	3
10	Cream-salmon to light brown	3
13	Dark brown to light brown	7
14	Cream-salmon to white	12
Total samples		82

*Samples from groups 11 and 12 were not obtained.

Table 1. Isolates sampled from each of the morphology groups defined by Maridueña-Zavala (2016)*.

with sterile water. Inoculated pods were placed in a moist chamber to promote the germination of conidia. External severity of symptoms was assessed using the disease severity scale (SS) from 0 to 5 based on previous studies⁸ and shown in Table 2.

The disease severity index (DSI) was calculated using Equation 1¹⁹.

$$DSI = \sum_{i=0}^5 SS_i \times n_i / N \times 100 \% \quad 1$$

Where n_i is the number of pods showing symptoms at the severity scale i , and N is the total number of pods inoculated.

Values of DSI were recorded at 0, 3, 7, 12, and 16 days after inoculation, and the area under the disease progress curve (AUDPC) was estimated using Equation 2²⁰:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{N_i-1} \frac{DSI_i + DSI_{i+1}}{2} (t_{i+1} - t_i) \quad 2$$

Where the DSI values were recorded at the time intervals t_i , all the experiments were run in triplicate.

Sensitivity to compost tea

A compost tea with antifungal properties was prepared exactly as described in previous reports¹⁵. Compost tea doses

of 0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 and 5 % were prepared in PDA. Three-millimeter disks of *M. roreri* mycelia from morphology groups 3, 8, and 14 were transferred onto the PDA containing the different compost tea concentrations. The plates were then incubated at 27 °C, and the mycelial diameter was measured at 3, 6, 9, and 12 days after inoculation. Other morphology groups were not tested as the preliminary data suggested no significant differences in the sensitivity to compost tea among the different groups.

Statistical analyses

Analysis of variance ANOVA compared values of AUDPC obtained by each morphology group tested, and significance was reported for $P < 0.05$. Inhibitory concentrations 50 (IC 50) were estimated from the mycelial growth data obtained at the different compost teas concentrations using Prism 7 software (GraphPad, La Jolla, CA 92037 USA). T-test was used to compare the means of IC50, and significance was reported at $p < 0.05$.

Results

A total of 82 isolates were obtained and the identity was

Scale	Symptoms
0	No symptoms
1	Few and small oil spot
2	Plenty and clear Oil spot, deformation or irregular mature.
3	Necrosis without sporulation
4	Necrosis and sporulation in less than the quarter part of the fruit.
5	Necrosis and sporulation in more than the quarter part of the fruit.

Table 2. Severity scale of cocoa pods infected with *M. roreri*.

confirmed as *M. roreri* by the DNA sequence of the ITS region.

Pathogenicity test

All isolates could infect the harvested cacao pods and cause identical symptoms to FPD reported in plant-attached pods (Figure 1). Isolates from morphology groups 1, 2, 4, 6, 8, 10, 13, and 14 caused the first FPD symptoms 3 days after pod inoculation, whereas pods inoculated with isolates from groups 3, 5, 7 and 9 showed FPD symptoms from day 7 onwards (Figure 2). Similarly, all isolates produced DSI of 75 % or higher within 16 days after the pathogen's inoculation on the harvested pods (Figure 2) and yielded AUDPC values of 25 or above (Figure 3). The lowest AUDPCs were caused by groups 3 and 5 ($P < 0.05$)

while the rest of the groups produced similar AUDPC values (Figure 3), but no correlation was found between the AUDPC values and the morphology groups.

Compost tea significantly inhibited the growth of *M. roreri* at concentrations of 1 % or above and was able to fully inhibit the growth of all isolates tested at 4.5 % or higher (Figure 4). The IC50 values were above 4 % for all isolates tested (Figure 5), but no significant differences were found when comparing the IC50 values of the different morphology groups.

Discussion

Most isolates caused the first FPD symptoms on day 3 af-



Figure 1. Typical FPD symptoms produced on harvested cacao pods inoculated with *M. roreri*.

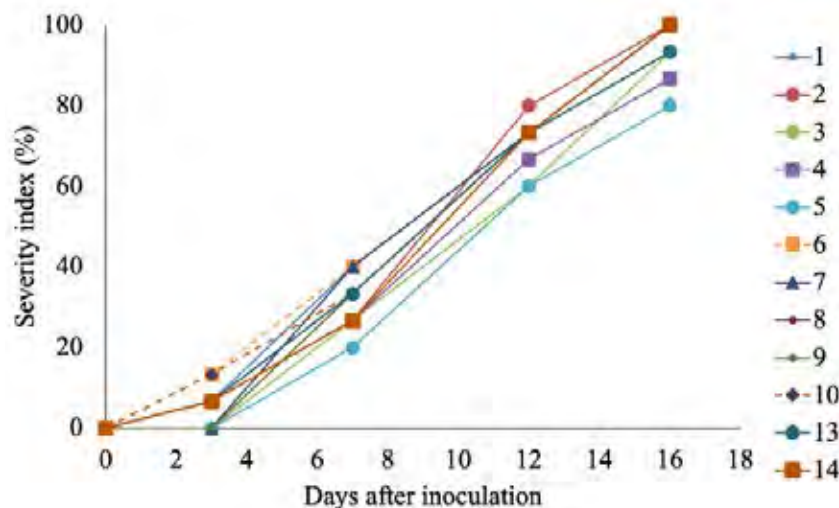


Figure 2. FPD disease progression on harvested cacao pods inoculated with *M. roreri* isolates belonging to the morphology groups described in Table 1.

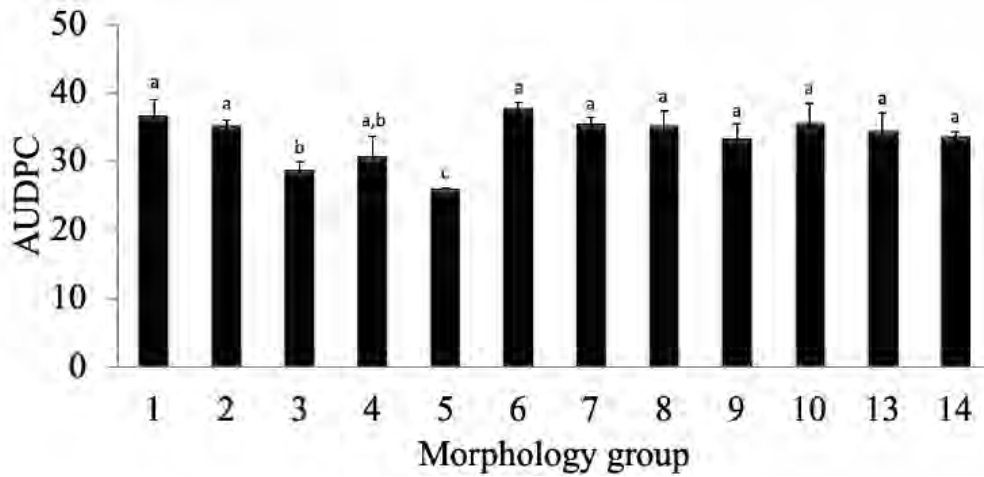


Figure 3. Values of the area under the disease progress curve (AUDPC) for *M. royeri* groups are described in Table 1. Different letters represent significant differences at $p < 0.05$

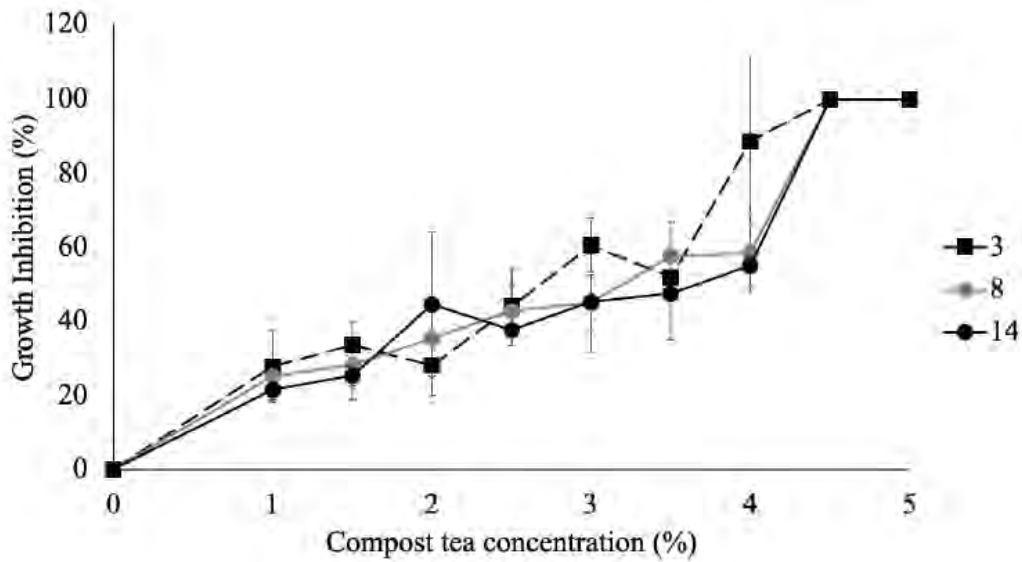


Figure 4. Growth inhibition of *M. royeri* from morphology groups 3, 8, and 14 by compost tea.

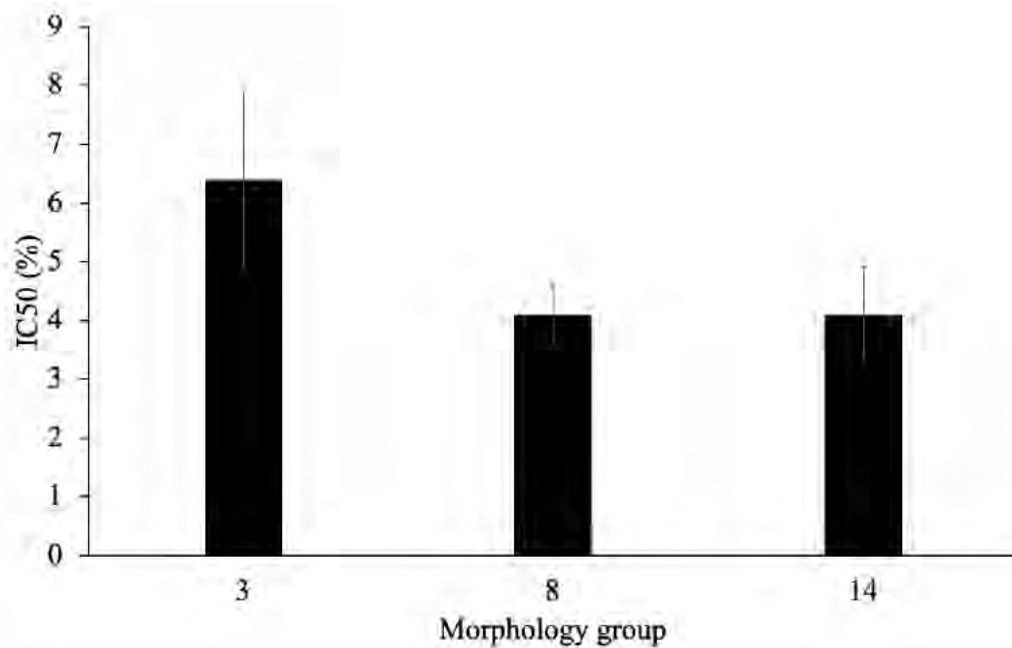


Figure 5. Inhibitory concentration 50 (IC50) values of *M. royeri* from morphology groups 3, 8, and 14 by compost tea.

ter inoculation and all isolates were able to fully produce the FP symptoms on the harvested cacao pods within 16 days after inoculation. This disease progression is significantly faster than that observed for plant-attached pods, in which progression times of 9 weeks^{7,8} to 3 months⁶ have been reported. The data suggest that the asymptomatic-biotrophic phase of FPD was absent or significantly shortened in harvested ripe cacao pods inoculated with *M. roreri*. Results are similar to those observed in other fungal pathogens such as *Colletotrichum spp.* When infecting ripe harvested fruits, *Colletotrichum spp.* can produce fruit rot with a shortened biotrophic phase. However, this phase can be extended if *Colletotrichum spp.* infects unripe harvested fruits²¹. Further research is needed to assess the pathogenicity of *M. roreri* in harvested cacao pods of different ripening levels.

No correlation between pathogenicity and fungal morphology was observed. Results agree with previous reports in which isolates of *M. roreri* with different levels of aggressiveness showed no correlation with genetic variation⁹. Additionally, various fungal species' pathogenicity can be dissociated from morphological switching and in vitro growth rate²².

The compost tea significantly inhibited the growth of all *M. roreri* isolates at concentrations of 1 % or above, reaching full inhibition at concentrations of 4.5 % or greater. The compost tea concentrations effective against *M. roreri* were lower than the 5 to 20 % needed for the control of other fungal pathogens such as *Alternaria solani*²³, *Alternaria alternate*, *Botrytis cinerea*, and *Pyrenochata lycopersica*²⁴ but higher than the 2.5 % required to inhibit the growth of *M. perniciosa*²⁵, suggesting an intermediate to high sensitivity of *M. roreri* to compost tea. Further research is needed to assess the sensitivity of *M. roreri* to compost tea in the field.

Conclusions

All the morphology groups of *M. roreri* were able to produce FPD necrotrophic symptoms in harvested pods during the 16-day evaluation period. Therefore, the biotrophic phase of the disease was likely absent or significantly shortened. Compost tea effectively controlled the pathogen's growth *in vitro* at concentrations from 1 to 4.5 %, showing the potential for applications in organic plantations. This is the first report presenting *M. roreri* isolates' pathogenicity from different morphology groups on harvested cacao pods.

Funding information

VLIR-UOS financed this research under grant VLIR Network Ecuador.

Acknowledgment

Not applicable.

Competing interest

There are no competing or financial interest associated to this research.

Bibliographic references

- Argout X, Fouet O, Wincker P, et al. Towards the understanding of the cocoa transcriptome: Production and analysis of an exhaustive dataset of ESTs of *Theobroma cacao* L. generated from various tissues and under various conditions. *BMC Genomics*. 2008;9(1):512. doi:10.1186/1471-2164-9-512
- Freire J. Proyecto de Reactivación del Cacao Nacional Fino o de Aroma. Cocoa connect. <http://www.cocoaconnect.org/presentation/proyecto-de-reactivacion-del-cacao-nacional-fino-o-de-aroma>. Published 2012.
- CacaoWeb. About the Cacao Tree. About the Cacao Tree. <http://www.cacaoweb.net/cacao-tree.html>. Published 2003.
- Loor RG, Risterucci a. M, Courtois B, et al. Tracing the native ancestors of the modern *Theobroma cacao* L. population in Ecuador. *Tree Genet Genomes*. 2009;5(3):421-433. doi:10.1007/s11295-008-0196-3
- Maridueña-Zavala MG, Villavicencio-Vásquez ME, Cevallos-Cevallos JM, Peralta EL. Molecular and morphological characterization of *Moniliophthora roreri* isolates from cacao in Ecuador. *Can J Plant Pathol*. 2016;38(4):460-469. doi:10.1080/07060661.2016.1261372
- Bailey BA, Evans HC, Phillips-Mora W, Ali SS, Meinhardt LW. *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot. *Mol Plant Pathol*. 2018;19(7):1580-1594. doi:10.1111/mpp.12648
- Bailey BA, Crozier J, Sicher RC, et al. Dynamic changes in pod and fungal physiology associated with the shift from biotrophy to necrotrophy during the infection of *Theobroma cacao* by *Moniliophthora roreri*. *Physiol Mol Plant Pathol*. 2013;81:84-96. doi:10.1016/j.pmpp.2012.11.005
- Phillips-Mora W, Castillo J, Krauss U, Rodriguez E, Wilkinson MJ. Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathol*. 2005;54(4):483-490. doi:10.1111/j.1365-3059.2005.01210.x
- Nyadanu D, Akromah R, Adomako B, et al. Host Plant Resilience to Phytophthora Pod Rot in Cacao. *Int J Bot*. 2012;8(1):13-21. http://worldcocoaoundation.org/wp-content/files_mf/nyadanu2012.pdf. Accessed 27 July, 2015.
- Iwano AD, Sreenivasan TN, Umaharan P. Cacao resistance to Phytophthora: Effect of pathogen species, inoculation depths and pod maturity. *Eur J Plant Pathol*. 1998;104(1):11-15. doi:10.1023/A:1008622115731
- Peter T, Godfried O-M, Emmanuel M. The rot fungus *Botryodiplodia theobromae* strains cross infect cocoa, mango, banana and yam with significant tissue damage and economic losses. *African J Agric Res*. 2014;9(6):613-619. doi:10.5897/AJAR2013.7528
- Quingaísa E. Estudio de caso: denominación de origen "cacao arriba." 2007:70.
- Naturland – Association for Organic Agriculture. How to Grow Organic Cocoa.
- Milton B, Alfonso V, Andrea M, et al. Comportamiento Agroproductivo De 31 Clones De Cacao Nacional (*Theobroma Cacao* L.) Con La Aplicación De Un Biocontrolador Para Moniliasis (*Moniliophthora Roreri*). *Investig y Saber*. 2016;V(1):39-54.
- Jimenez M, Van der Veken L, Neirynck H, Rodríguez H, Ruiz O, Swennen R. Organic banana production in Ecuador: Its implications on black Sigatoka development and plant-soil nutritional status. *Renew Agric Food Syst*. 2007;22(04):297-306. doi:10.1017/S1742170507001895
- Magdama F. Estudio del efecto de Bioles y cepas de *Trichoderma sp.* aisladas de zona cacaotera, como alternativa de control de *Moniliophthora roreri*, en condiciones in vitro. 2010.
- Phillips-Mora W, Cawich J, Garnett W, Aime MC. First report of frosty pod rot (moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Belize. *Plant Pathol*. 2006;55(4):584-584. doi:10.1111/j.1365-3059.2006.01378.x
- Phillips-Mora W. Evaluación de Resistencia de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) a *Moniliophthora roreri* (cif. y Par) Evans et al.. Tesis de Magister scientiae. 1986.
- Dissanayake MLMC, Kashima R, Tanaka S, Ito S. Pathogenic variation and molecular characterization of *Fusarium* species isolated from wilted Welsh onion in Japan. *J Gen Plant Pathol*. 2008;75(1):37-45. doi:10.1007/s10327-008-0135-z

20. Madden L. The Study of Plant Disease Epidemics -. 2nd ed. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society; 2007. https://www.google.com.ec/webhp?sourceid=tool-bar-instant&hl=en&ion=1&qscr=1&rlz=1T4GGHP_enUS470US470&gws_rd=cr&ei=ZwpiUqraCYrI9QSuvoAg-#hl=en&q=The Study of Plant Disease Epidemics&qscr=1.
21. Alkan N, Fortes AM. Insights into molecular and metabolic events associated with fruit response to post-harvest fungal pathogens. *Front Plant Sci.* 2015;6(OCTOBER):889. doi:10.3389/fpls.2015.00889
22. Magee PT. Fungal pathogenicity and morphological switches. *Nat Genet.* 2010;42:560-561.
23. Mengesha WK, Gill WM, Powell SM, Evans KJ, Barry KM. A study of selected factors affecting efficacy of compost tea against several fungal pathogens of potato. *J Appl Microbiol.* 2017. doi:10.1111/jam.13530
24. Pane C, Celano G, Vilecco D, Zaccardelli M. Control of *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Pyrenochaeta lycopersici* on tomato with whey compost-tea applications. *Crop Prot.* 2012;38:80-86. doi:10.1016/j.cropro.2012.03.012
25. Maridueña-Zavala MG, Freire-Peñaherrera A, Espinoza-Lozano RF, Villavicencio-Vasquez M, Jimenez-Feijoo M, Cevallos-Cevallos JM. Genetic characterization of *Moniliophthora perniciosa* from Ecuador and in vitro sensitivity to compost tea. *Eur J Plant Pathol.* 2019;154(4):943-959. doi:10.1007/s10658-019-01714-1

Received: 20 November 2020

Accepted: 2 January 2021

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Estudio exploratorio de bacterias solubilizadoras de fósforo en dos hábitats asociados con *Cedrela montana* Moritz ex Turcz

An exploratory study of phosphorus-solubilizing bacteria in two habitats associated with *Cedrela montana* Moritz ex Turcz

Tanya Ascencio-Lino¹, Esther Matamoros-Alcívar¹, Verónica Sandoya-Sánchez¹, Milton Barcos-Arias², Jaime Naranjo-Morán²

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.20

Resumen: La disponibilidad de fósforo (P) en la corteza terrestre está limitada por la composición química del suelo, y por factores antropogénicos en el caso de ambientes perturbados. Debido a que solo el 0.1% de P está disponible para ser absorbido directamente por las plantas, se requiere de una interacción positiva con bacterias solubilizadoras de fósforo (BSF) para convertir el P insoluble a su forma soluble, y hacerlo disponible para las plantas. Aun siendo esta asociación de gran importancia, existe poca información sobre la presencia de BSF en especies arbóreas, especialmente de ambientes montanos andinos. El objetivo de esta investigación fue identificar la presencia de BSF en la rizosfera de dos individuos de cedro andino (*Cedrela montana*), provenientes de bosque secundario (BS) y zona de pastizal (ZP), respectivamente, de la localidad de Intag (norte de la Cordillera Occidental del Ecuador). Se recolectaron un total de tres muestras de suelo de cada rizósfera, las cuales fueron enriquecidas con fosfato tricálcico, y cultivadas en medio selectivo NBRIP para determinar la presencia de BSF. Se obtuvieron 54 aislados de BS y 46 de ZP, con capacidad de solubilización de fósforo. Los aislados BS-5, BS-6 y ZP-10 alcanzaron los índices de solubilización de fosfato más altos, con valores de 4.63, 2.75 y 2.08, respectivamente. Los resultados sugieren que las BSF, procedentes de suelo rizosférico de *C. montana*, están presentes en ambos hábitats (BS y ZP), donde fueron encontrados aislados promisorios; sin embargo, aquellos provenientes de BS mostraron una mayor capacidad solubilizadora de fósforo inorgánico. La información obtenida en este estudio servirá de base para el desarrollo futuro de bioinóculos específicos que permitan la propagación del cedro andino en condiciones de invernadero.

Palabras clave: Aislados promisorios, bacterias solubilizadoras de fósforo, bosque montano, bosque secundario, zona de pastizal, *Cedrela montana*.

Abstract: The availability of phosphorus (P) in the earth's crust is limited by the chemical composition of the soil, and by anthropogenic factors in disturbed environments. Only 0.1% of P is available to be absorbed directly by plants, positive interaction with phosphorus solubilizing bacteria (PSB) is required to convert P insoluble to its soluble form and make it available to plants. Although this association is of great importance, there is little information over presence on BSF in tree species from Andean montane forests. The objective of this research was to identify the presence of BSF in the rhizosphere of two individuals of Andean cedar (*Cedrela montana*), from the secondary forest (BS) and grassland zone (ZP), located in Intag (north of the Western Cordillera of Ecuador). A total of three samples were collected from the soil of each rhizosphere, which was enriched with tricalcium phosphate, and cultured in NBRIP selective medium to determine the presence of BSF. We obtained 54 BS isolates and 46 ZP isolates, with phosphorus solubilization capacity. The BS-5, BS-6, and ZP-10 reached the highest phosphate solubilization indices, with values of 4.63, 2.75, and 2.08. The results suggest that BSF, from rhizospheric soil of *C. montana*, is present in both habitats (BS and ZP), where we found promising isolates; however, those from BS showed a greater solubilizing capacity of inorganic phosphorus. The information obtained in this study will serve as the basis for the future development of specific bioinoculants that allow the propagation of Andean cedar under greenhouse conditions.

Key words: Isolates, phosphorus solubilizing bacteria, montane forest, secondary forest, grassland zone, *Cedrela montana*.

Introducción

El fósforo (P) es un nutriente esencial para las plantas, ya que es parte integral de sus actividades metabólicas y de desarrollo^{1,2}. El P tiene un ciclo sedimentario y su presencia es limitada en el suelo; al no estar disponible en la atmósfera, los microorganismos son esenciales para mantener su ciclo natural. Este importante elemento químico es absorbido por las plantas a través de procesos de solubilización y mineralización^{1,3}, en los cuales intervienen los microorganismos. Estos actúan como mediadores de la disponibilidad de P, al liberarlo desde las reservas inorgánicas y orgánicas del suelo para aprovechamiento de las plantas. La solubilización del P media-

da por microorganismos es un proceso relevante y complejo, que depende de las condiciones nutricionales y fisiológicas de cada individuo³. Los principales microorganismos asociados a esta importante actividad son las bacterias solubilizadoras de fósforo (BSF).

Las BSF representan alrededor del 10% de la población microbiana del suelo¹. En especies arbóreas de lotes experimentales se han encontrado varias cepas de BSF del género *Bacillus* y *Pseudomonas*⁴. Sin embargo, existe un vacío de información referente a BSF asociadas a especies forestales en bosques de los Andes tropicales.

¹ Universidad Yachay Tech, Escuela de Ciencias Biológicas e Ingeniería, Imbabura, Ecuador.

² Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias de la Vida, FCV, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, CIBE, Guayaquil, Ecuador.

Nuestro estudio evalúa, la presencia de BSF en la rizósfera de una especie forestal, *C. montana* (cedro andino), distribuida en bosques montañosos de la Cordillera Occidental de Ecuador⁵. Esta especie se encuentra incluida en el apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora silvestres (CITES)⁶. Esta situación de amenaza se debe principalmente a su extracción indiscriminada desde áreas de distribución natural, debido a las cualidades de su madera⁷. Por otro lado, áreas con presencia de esta especie han estado expuestas a deforestación y conversión extensiva de bosques a pastizales, lo que ha ocasionado pérdida de fertilidad, calidad y biodiversidad del suelo^{8,9}. Por tales razones, es indispensable obtener bacterias nativas solubilizadoras de P para incrementar a futuro la adaptación y crecimiento de *C. montana* en suelos con distinta cobertura vegetal.

Materiales y métodos

Área de estudio

Las muestras de suelo rizosférico de *C. montana* fueron colectadas en dos diferentes hábitats, BS y ZP, en la localidad de La Neblina – Intag, al norte de la Cordillera Occidental del Ecuador, en las coordenadas N 0°20'06.8" y W 78°25'33.5" (Figura 1). En cada hábitat se recolectaron, con un barreno y hasta una profundidad de 20 cm¹, un total de tres muestras simples de suelo. Las muestras fueron homogeneizadas *in situ*, obteniendo así una muestra de suelo compuesta, de aproximadamente 1 kg, para facilitar su posterior uso en el laboratorio.

Análisis de muestras en laboratorio

Se realizaron tres tratamientos (T) sobre las muestras de ambos hábitats: BS y ZP. Inicialmente, se tomaron 50 g de suelo de cada muestra, y se aplicaron los siguientes tratamientos, T1: con 50 g de fosfato tricálcico, T2: con 0.015 g de fosfato

tricálcico, y T3: control, sin el enriquecimiento previo^{2,3,7}. Los T fueron mantenidos durante siete días, a temperatura ambiente, después de este tiempo se procedió a la siembra de los microorganismos. De cada T se realizaron tres diluciones seriadas (base 10): 10⁻¹, 10⁻³ y 10⁻⁵, se tomaron 0.1 ml de cada dilución, con una micropipeta, y se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo selectivo NBRIP (Nautiyal, 1999)¹⁰, considerando tres repeticiones para cada dilución; obteniendo un total de 54 cajas Petri para crecimiento de BSF, 27 por cada hábitat. Todas las cajas sembradas se incubaron a 28°C durante cuatro días.

Luego del tiempo de incubación, de las 54 cajas cultivadas, se seleccionaron 20 aislados promisorios de BSF, 10 aislados por cada hábitat, para proceder con su aislamiento individual (cultivos puros) en medio NBRIP. El criterio de selección de los aislados de BSF, se basó en: 1.- presencia de halos de solubilización de P, y 2.- diferencias morfológicas entre los aislados (color, tamaño, forma y textura).

El medio NBRIP, contiene fosfatos que al ser solubilizados por las BSF deja un halo claro alrededor de la colonia³. En los cultivos puros de los aislados promisorios de BSF se midieron el diámetro de la colonia y el diámetro del halo de solubilización, con ayuda de un calibre, durante cuatro semanas. Estas medidas fueron utilizadas para obtener el índice de solubilización de fosfatos (ISF), mediante la fórmula propuesta por Becerra (2012)¹¹:

$$ISF = (d_c + d_h) / d_c$$

Donde, es diámetro de la colonia y es el diámetro del halo.

Todas las muestras fueron analizadas en el Centro de Investigación de Biotecnologías de Ecuador (CIBE-ESPOL), Guayaquil-Ecuador.

Resultados y discusión

Luego de la primera semana de evaluación, el desarrollo

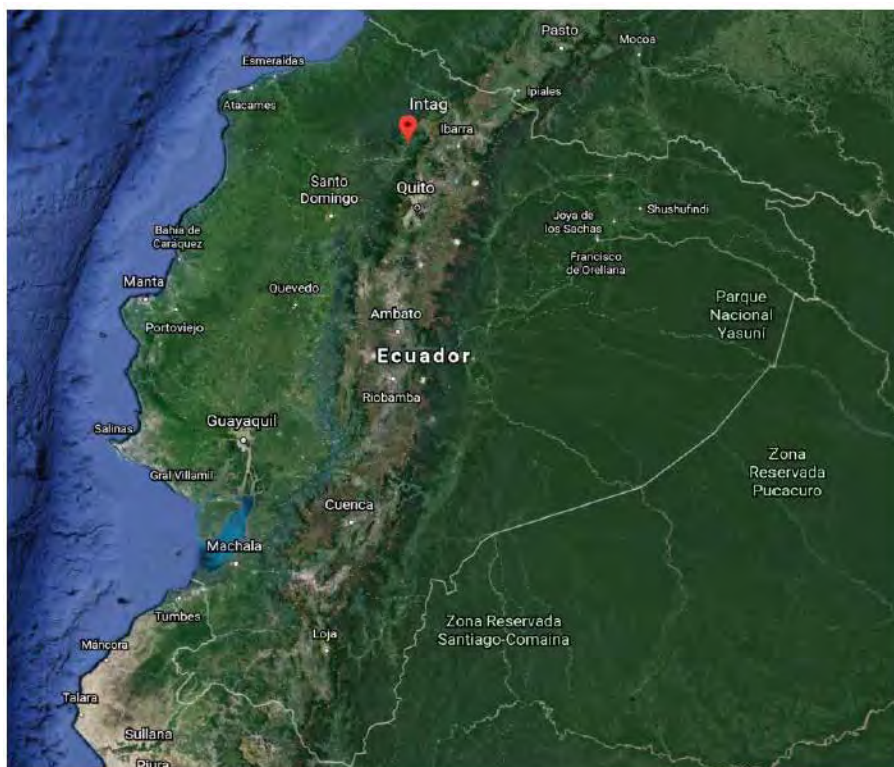


Figura 1. Área de estudio, localidad La Neblina en Intag, provincia de Imbabura (imagen Google Earth, 2020).

del halo de solubilización del P se pudo medir en tres aislados promisorios del cultivo puro, dos provenientes de BS (BS-5 y BS-6) y uno de ZP (ZP-10) (Figura 2); mientras que el resto de aislados no mostraron un crecimiento visible del halo. Pese a la baja cantidad de aislados, se esperaba esta diferencia debido al tipo de suelo que proviene de cada hábitat¹². Las muestras de suelo de la rizosfera de *C. montana* en BS se caracteriza por ser negro y profundo, formado por cenizas volcánicas jóvenes¹³, y un alto contenido de P, con concentraciones entre 28.27 y 29.17 ppm¹⁴. Sin embargo, perturbaciones antrópicas podrían alterar estas características edáficas, y por ende la diversidad microbiana; según Usiche et al., la abundancia y diversidad de las BSF se ven altamente afectadas por el uso del suelo entre bosque y pastizal¹⁵.

Respecto al ISF, los mayores valores se obtuvieron en los aislados promisorios BS-5 y BS-6, con 3.43 y 2.52, respectivamente; seguido del aislado ZP-10 con un valor de 2.08 (Figura 3). Se ha demostrado que el ISF puede alcanzar valores de hasta 12.0, bajo incubación con fosfato tricálcico¹⁶. No obstante, la eficiencia de solubilización se evaluó en base a la escala formulada por Silva Filho & Vidor¹⁷, donde los valores por encima de 3.0 se clasificaron como solubilizadores altos (BS-5), y los valores de 2.0 a 3.0 como solubilizadores medios (BS-6 y ZP-1). Aún en los aislados provenientes de BS, los ISF son distintos, posiblemente porque se trata de dos géneros bacterianos con diferente capacidad solubilizadora. Existen bacterias que utilizan diferentes mecanismos de solubilización de P, como por ejemplo la producción de ácidos orgánicos, siendo el género *Bacillus* sp. el más representativo de este grupo¹⁸.

Por otro lado, dado que el ISF es directamente proporcional a la actividad de solubilización de P por parte de las BSF, los aislamientos bacterianos con altos ISF resultan potencialmente efectivos para ser incluidos en el desarrollo de biofertilizantes fosfatados⁴; que, a partir de esta investigación, podrían ser empleados en el crecimiento *ex situ* de *C. montana*. Este podría ser el caso del aislado promisorio BS-5 que alcanzó el mayor valor de ISF, al cual se le aplicó el T1 (50 g de fosfato tricálcico), lo que sugiere una estrategia efectiva de selectividad al tratamiento empleado. Como menciona Sánchez *et al.*¹⁹, se puede inferir que el efecto positivo de los microorganismos se pudo deber a un aumento en la disponibilidad de P en suelo, en forma de fosfato tricálcico.

Por otro lado, el aislado proveniente de suelo rizosférico de *C. montana* ZP no mostró crecimiento bacteriano luego de la primera semana de evaluación, y su ISF se mantuvo sin incrementos visibles (Figura 3); esto puede sugerir una degradación biológica del suelo por el exceso de perturbaciones generadas en a este tipo de hábitat²⁰. Los pastizales son sistemas de rápido crecimiento y por lo general son deficientes en fosfatos por lo que los resultados obtenidos concuerdan con estudios donde se alteran los factores edafoclimáticos de las comunidades de bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico^{21,22}.

Conclusiones

Los resultados de esta investigación confirman la presencia de BSF en la rizósfera de *C. montana*, en ambos hábitats,

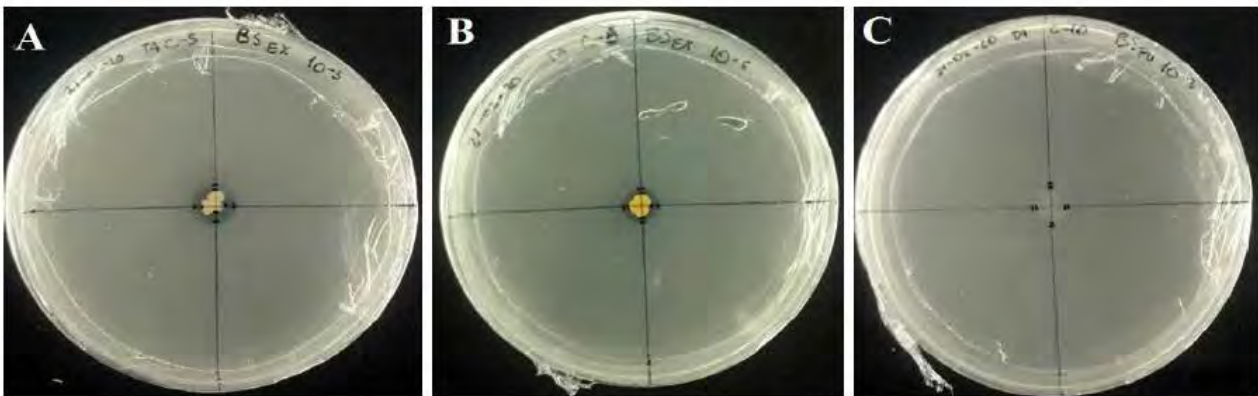


Figura 2. Aislados promisorios mostrando su halo de solubilización después de la primera semana de incubación: A) BS-5, B) BS-6 y C) ZP-10.

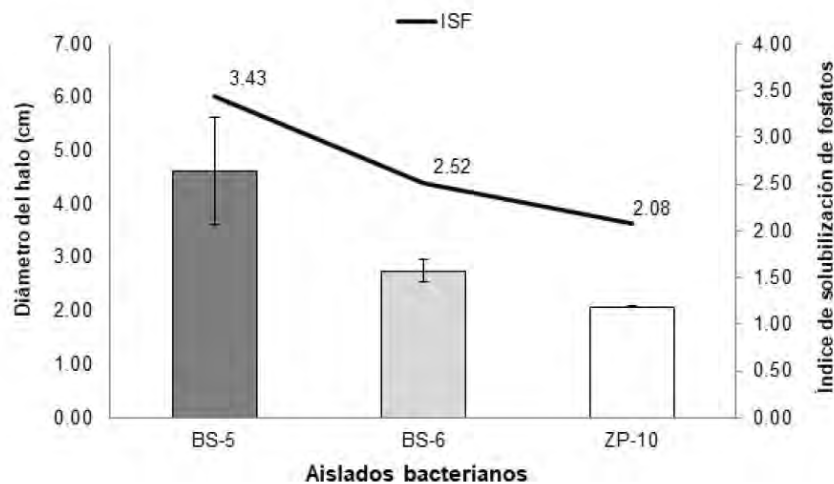


Figura 3. Crecimiento del halo de solubilización de los tres aislados promisorios y línea de tendencia del índice de solubilización de fosfatos (ISF), durante la cuarta semanas de evaluación.

BS y ZP. Por otro lado, el enriquecimiento con fosfato tricálcico brinda un mejor criterio de selección para la bioprospección de microorganismos nativos en suelos rizosféricos de *C. montana* en BS.

Es importante mencionar que, aunque nuestro estudio muestra resultados preliminares en cuanto a la capacidad solubilizadora de BSF asociadas a dos hábitats de *C. montana*, con distinto grado de perturbación, nosotros podemos concluir que los aislados bacterianos promisorios obtenidos en los bosques más conservados tiene mayor capacidad solubilizadora de P inorgánico; por lo que, estos podrían servir como fuente prometedora de bioinsumos para favorecer el crecimiento de *C. montana*, y otras especies forestales, *ex situ*.

Agradecimientos

Agradecemos a Ms. C. Abigail Montero y Mg. Rodrigo Oviedo, por su contribución en las pruebas de laboratorio. La investigación fue financiada por la Corporación Ecuatoriana para el Desarrollo de la Investigación y la Academia CEPRA XIII-2019-03.

Referencias bibliográficas

1. Cater M, Parkin G, Culley J, Hao X, Ball B. Soil Density and Porosity. 2007 doi:10.1201/9781420005271.ch57.
2. Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl Soil Ecol* 2006; 34: 33-41.
3. Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 1999; 17: 319-339.
4. Ávila Martínez EG, Lizarazo Forero LM, Cortés Pérez F. Promoción del crecimiento de *Baccharis macrantha* (Asteraceae) con bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a su rizosfera. *Acta Biol Colomb* 2015; 20: 121-131.
5. Volland F, Pucha D, Bräuning A. Hydro-climatic variability in southern Ecuador reflected by tree-ring oxygen isotopes. *Erdkunde* 2016; 70: 69-82.
6. CITES, UNEP. Apéndices I, II y III Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres. 2019; 41: 80.
7. Gunter S, Weber M, Stimm B, Mosandl R. *Silviculture in the Tropics*. Springer Heidelberg Dordrecht London New York. 2011 <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-19986-8>.
8. Vallejo Quintero VE. Importancia y utilidad de la evaluación de la calidad de suelos a través del componente microbiano: Experiencias en sistemas silvopastoriles. *Colomb For* 2013; 16: 83.
9. Valera CA, Valle Junior RF, Varandas SGP, Sanches Fernandes LF, Pacheco FAL. The role of environmental land use conflicts in soil fertility: A study on the Uberaba River basin, Brazil. *Sci Total Environ* 2016; 562: 463-473.
10. Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 170: 265-270.
11. Becerra J, Quintero D, Martínez M, Matiz A. Characterization of phosphate solubilizing microorganisms isolated from soils planted with cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Rev Colomb Ciencias Hortícolas* 2011; 5: 195-208.
12. Souchie EL, Saggin OJ, Silva EMR, Campello EFC, Azcón R, Barea JM. Communities of P-solubilizing bacteria, fungi and arbuscular mycorrhizal fungi in grass pasture and secondary forest of paraty, RJ - Brazil. *An Acad Bras Cienc* 2006; 78: 183-193.
13. Jara Torres PP. Efectos del cambio de la cobertura vegetal y del uso de la tierra sobre la cantidad y calidad de materia orgánica del suelo en ecosistemas Alto-Andinos de Ecuador. 2018. doi:10.14201/gredos.140319.
14. Cáceres H. Evaluación de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo en plantaciones de *Pinus radiata*, en tres sitios de la Región Sierra Ecuatoriana. 2017. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/7445>.
15. Useche YM, Valencia H, Perez H. Caracterización de bacterias y hongos solubilizadores de fosfato bajo tres usos de suelo en el Sur del Trapecio Amazónico. *Acta Biológica Colomb* 2004; 9: 129-130.
16. Kandjimi OS, Uزابakirihó J, Chimwamurombe PM. Isolation and characterization of culturable bacteria from bulk soil samples and the rhizosphere of arid-adapted *Tylosema esculentum* (Burchell). A. Schreiber (Marama bean) in Namibia. *African J Biotechnol* 2015; 14: 944-952.
17. Silva Filho GN, Vidor C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Rev Bras Ciência do Solo* 2000; 24: 311-319.
18. Corrales Ramírez, MSc LC, Arévalo Galvez ZY, Moreno Burbano VE. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova* 2014; 12: 67.
19. Sánchez López DB, Romero Perdomo FA, Bonilla Buitrago RR. Respuesta de *Physalis peruviana* L. A la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato. *Rev Mex Ciencias Agrícolas* 2018; 5: 901.
20. López R. Degradación del suelo: causas, procesos, evaluación e investigación. 2002. <http://www.serbi.ula.ve/serbiula/libros-electronicos/Libros/degradacion/pfd/librocompleto.pdf>.
21. Zeng Q, Wu X, Wang J, Ding X. Phosphate solubilization and gene expression of phosphate-solubilizing bacterium *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 under different levels of soluble phosphate. *J Microbiol Biotechnol* 2017; 27: 844-855.
22. Zheng BX, Zhang DP, Wang Y, Hao XL, Wadaan MAM, Hozzein WN et al. Responses to soil pH gradients of inorganic phosphate solubilizing bacteria community. *Sci Rep* 2019; 9: 1-8.

Received: 20 noviembre 2020

Accepted: 20 enero 2021

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Chemical evaluation and anti-radical activity of varieties of *Morus alba* L. (*morera, moraceae*) from VenezuelaDaynet Sosa del Castillo^{1,2}, José Johnatan Quintero Mesa³, Yeifre José Rojas Alvear³, María Rodríguez³, Ramón Antonio Rea Suárez² y Migdalia Miranda Martínez¹

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.21

Abstract: Mulberry (*Morus alba* L.), known as white mulberry, is a plant widely used in medicine and food due to its chemical composition. The qualitative study of the primary and secondary metabolites of the methanolic extracts of the four varieties of Morera was developed by chromatographic profile (TLC) against standards. Quantification was performed through colorimetric assays. All results were analyzed through statistical analysis. The results indicated the existence of similarities between varieties for both primary and secondary metabolites. The radical capacity of the varieties analyzed was also evaluated by finding that the Táchira variety had the highest anti-radical capacity with an IC50 of $553.58 \pm 3.23 \mu\text{g} / \text{mL}$ followed by the Maracay IC50 varieties of $1054.01 \pm 1.76 \mu\text{g} / \text{mL}$, Boconó IC50 of $1398.93 \pm 2.23 \mu\text{g} / \text{mL}$ and Yu-62 IC50 of $3817.89 \pm 18.08 \mu\text{g} / \text{mL}$. It was found that the use of the thin layer chromatography (CCF) technique was efficient to detect the presence of phenolic compounds, soluble carbohydrates, and amino acids in the four varieties studied. The Yu-62 variety had the highest total phenol contents and proteins; the amino acid content was higher for the Táchira variety, while the soluble carbohydrate content was higher in the Boconó variety. The presence of saponins was not detected in any of the four varieties evaluated.

Key words: Antiradical ability, Mulberry, primary metabolites, secondary metabolites, qualitative profile, quantification, varieties.

Introduction

The mulberry is a shrub with shiny-light green leaves, prominent whitish veins on the underside, and an asymmetric base¹; purple, white, black, or pink fruits with a length of 5 cm².

It is native to Asian countries, used in sericulture, and introduced to other continents, which has led to the creation and extension of a large number of varieties with excellent biomass production, nutritional quality, and high resistance to attack by pests and diseases in a wide range of climate and soil conditions³.

For the genus, *Morus* a total of 24 species are reported⁴, the best-known being *M. alba*, *M. nigra*, *M. indica*, *M. laevigata* and *M. bombycis*, which are distributed all over the world, from temperate areas (altitude: 4000 masl) to tropical (dry and humid)⁵, grouped into five regions⁶: East Asia, Archipelago of Malaysia, Southwest Asia, North, Central, and South America and West Africa.

According to Chan *et al.*⁷, mulberry foliage is the leading food of silkworms; its leaves are used as food for livestock and its fruits as food products.

Flavonoids and phenolic compounds, in general, are the main components of the plant in its various organs, also mentioning alkaloids, amino acids, and fatty acids, among others. Various biological activities are reported for the species' leaves, including antioxidants, antimicrobial, skin whitening, cytotoxic, antidiabetic, glycosidase inhibition anti-hyperlipidaemias, anti-atherosclerotic, anti-obesity, cardioprotective, and enhancement cognitive⁷⁻¹². Fruits are rich in anthocyanins and alkaloids with antioxidant, antidiabetic, antiatherosclerosis, anti-obesity, and hepatoprotective activities^{13,14}. The root's bark contains flavonoids, alkaloids, and stilbenes, with antimicrobial, skin whitening, cytotoxic, anti-inflammatory anti-hyperlipidaemic properties¹⁵. Other pharmacological properties of *M. alba* include antiplatelet, anxiolytic, antiasthmatic, anthelmintic,

antidepressant, cardioprotective, and immunomodulatory activities. The phytochemistry and pharmacology of the different parts of the mulberry tree confirm its traditional and current uses as forage, food, cosmetics, and medicine, the species being a plant with promising medicinal properties⁷. This work's objective was to study comparatively the chemical composition and root activity of the leaves of four varieties of *Morus alba* cultivated in Venezuela.

Methods

Collection and treatment

The *Morus alba* varieties studied were collected in the greenhouse of the Institute for Advanced Studies (IDEA), located at an altitude of 1179 meters above sea level, 10° 25'59" N, 66° 52'59" W, in the Baruta municipality, Miranda state of the Metropolitan District of Caracas, where they are identified as Maracay (Ma 001), Táchira (Ta 002), Boconó (Bo 003) and Yu-62 (Yu 004).

The varieties used were collected from plants with a height of no more than 50 cm in height and little biomass, with leaves of approximately 8 cm long.

Two procedures were carried out: In the first, samples of 10 leaves of each plant per variety (three plants) were taken, and they were dried in the open air for one week, then crushed and macerated in methanol for the preparation of the corresponding extract. In the second procedure, 10 leaves were taken from each plant (total 30); they were cleaned with water and alcohol for transfer to the laboratory in a cellar with liquid nitrogen. The leaves were macerated with liquid nitrogen and stored in a refrigerator at a temperature of -80 ° C for later use.

¹ Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias de la Vida, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Guayaquil, Ecuador.

² Área de Agricultura y Soberanía Alimentaria, IDEA, Instituto de Estudios Avanzados, Caracas, Venezuela.

³ Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Extraction and analysis of varieties

Protein extraction: 100 mg of the sample placed in Eppendorf tubes were added 1 mL of buffer constituted by Tris-HCl, urea, EDTA disodium salt, tween 20, sodium diacid phosphate and β mercapto-ethanol. It was stirred to homogenize; it was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min separating the solid (soluble proteins).

Extraction of carbohydrates and amino acids (as free proline)

100 mg of the sample placed in Eppendorf tubes were added 1 mL of 80% ethanol; it was stirred until homogenized, it was centrifuged at 4000 rpm for 8 min evaporated in the hood at room temperature until obtaining 1 mL aqueous phase: carbohydrates and amino acids. The process was repeated twice.

Extraction of Phenols (soluble and bound to the cell wall)

100 mg of the sample placed in Eppendorf tubes, 500 μ L of methanol were added, it was stirred until homogenized, it was centrifuged at 12000 rpm for 15 min. The supernatant contained soluble phenols. 250 μ L of 2M NaOH was added to the solid residue, it was stirred until homogenized, incubated at 70 ° C for 16 hours, neutralized with 250 μ L of 2M HCl, centrifuged, and the supernatant consisted of phenolic compounds bound to the cell wall.

Qualitative analysis of the varieties

TLC performed methanolic extracts, and the solvent systems and standards used were the following:

Quantification of primary and secondary metabolites

Metabolites	Standards	Solvent/developer system
Amino acids	L-proline, L-arginine	n-butanol: acetone: glacial acetic acid: water (35: 35: 10: 20), developer 2% ninhydrin in ethanol.
Carbohydrates	Sucrose, glucose	2-propanol-butanol-water (12: 3: 4), developer Naphthol in acid
Flavonoids	Routine.	Ethyl acetate-formic acid-glacial acetic acid-water (100: 11: 11: 10), UV developer 254 and 365nm

Amino acids, such as free proline

A 20 μ L aliquot of the plant extract was taken and diluted to a volume of 0.5 mL with distilled water. This was mixed with 0.5 mL of ninhydrin and 0.5 mL of acetic acid. It was stirred to homogenize and subsequently placed in a water bath at 100 ° C for 1h. It could cool. 2 mL of toluene was added, and it was stirred vigorously. L-proline solutions of different concentrations were prepared and the same treatment as the sample was applied as a standard. For quantification, a colorimetric method was used using ninhydrin as a reagent. The maximum absorption length was 520 nm¹⁶. The values of the samples were obtained from the corresponding calibration curve. The results were expressed in mg / g of fresh mass equivalent to L-proline.

Proteins

A 100 μ L aliquot was taken from the initial extraction and initially diluted to a volume of 10 mL with water. A 1 mL aliquot was taken, and then 1 mL of Bradford's reagent (Coomassie blue in sulfuric acid) was added and stirred until homogenized. It could settle. As a standard, bovine serum albumin solutions of different concentrations were prepared, and the same treatment as the sample was applied. Spectrophotometric analysis was performed for quantification using the Bradford method¹⁷. The values of the samples were obtained from the corresponding calibration curve. The results were expressed as mg / g of fresh mass equivalent to bovine serum albumin.

Total carbohydrates

A 100 μ L aliquot of the sample from the extraction was taken and diluted with distilled water to 1 mL. 0.5 mL of a 5% phenol solution and carefully 2.5 mL of concentrated sulfuric acid were added. It was stirred until homogeneous and allowed to stand for 30 min. Different concentrations of glucose solutions were prepared as a standard, and the same treatment as the sample was applied. The Dubois method¹⁸ carried out quantification. The maximum wavelength of absorption was 492 nm. The values of the samples were obtained from the calibration curve. The results were expressed in mg / g of fresh mass equivalent to glucose.

Soluble phenols bound to the cell wall (total phenols)

100 μ L of the plant extract was taken and diluted with 1 mL with distilled water. Subsequently, 100 μ L of the Folin-Ciocalteu reagent was added, and it was left to stand for 5 min. 600 μ L of 1M NaOH saturated with Na₂CO₃ was im-

mediately added and left to incubate at room temperature for 1h. Chlorogenic acid solutions of different concentrations were prepared as a standard. The same treatment as the sample was applied. Quantification was carried out by the Folin -Ciocalteu spectrophotometric method^{19,20}. The values of the samples were obtained from the corresponding calibration curve. The results were expressed in mg / g of fresh mass equivalent to chlorogenic acid.

Routine determination by HPTLC method

Once the thin layer chromatography was developed applying the conditions required for the analyzed sample and varying the concentration of the standard, maintaining a seeding volume of 3 μ L in each case, a photo was taken of each plate at a wavelength of 254 nm using a UV radiation lamp and maintaining the same focal distance for each of them. Said photo

was subjected to an executable program in MATLAB supplied by the laser laboratory of the School of Chemistry of the UCV Faculty of Sciences for the construction of the corresponding calibration curve.

Statistical analysis

Analysis of variance and test of means were performed on all the variables under study, applying the Di Rienzo, Guzmán, and Casanova's test (DGC). For this, the statistical program InfoStat 2013 (Di Rienzo *et al.*)²¹.

Results

Qualitative analysis. Visualization of the chemical profile of the varieties

Figure 1 shows the chromatographic profiles of the different primary and secondary metabolites evaluated: amino acids, carbohydrates, and flavonoids, indicating the solvent systems, developers, and standards used.

Quantification of free L-proline and proteins

Table 1 shows the results for the concentration of amino acids expressed as L-proline and proteins for the three replicates analyzed in the four varieties studied and the statistical analysis results.

Quantification of soluble carbohydrates and phenols

The quantification of soluble carbohydrates and total phenols is described in table 2, where the results of the statistical analysis are also expressed.

Routine quantification by HTLC in the *Morus alba* varieties: Maracay and Boconó and anti-radical activity

Table 3 shows the results of the routine quantification in the varieties that chromatographically gave positive results for this flavonoid, in addition to the determination of the anti-radical activity with DPPH, for the evaluation of the antioxidant activity of the extracts of the varieties under study also indicates the results of the statistical analysis.

Discussion

Qualitative analysis. Visualization of the chemical profile

The primary and secondary metabolites (amino acids, carbohydrates, proteins, and phenolic compounds) produce benefits to other living organisms that feed on the plants that contain them, facilitating their growth and development. In some studies, it has been shown that feeding different animals with mulberry leaves produces an increase in the meat's quality and other characteristics of the animals²²⁻²⁴.

Of the 20 essential amino acids present in mulberry leaves, the concentration levels of Proline, Glutamine, Glycine, and Valine²⁵ are considerable. It is possible to observe on the chromatographic plate (fig 1-I) a series of purple-violet spots associated with these compounds and a yellow-orange spot of Rf 0.36 corresponding to L-proline. Additionally, the arginine pattern Rf 0.17 could be observed. By comparing the chromatographic profile of the four varieties studied with the L-proline standard, with different intensities, in all the samples studied. Concerning carbohydrates, a very complex composition of monosaccharides and polysaccharides is proposed, highlighting the concentrations of glucose and sucrose²⁶; The qualitative analysis of the varieties Táchira, Maracay, Boconó and Yu-62, (fig 1-II), compared with the sucrose and glucose standards, showed spots coinciding with the standards, which shows their presence.

In the phenolic compounds for the chromatographic analysis, analysis conditions were used that allowed the detection of both flavonoids and glycosides thereof, considering previous reports of the detection of these metabolites in the species²⁷⁻²⁹. Figure 1-III shows the chromatographic profile of the different varieties studied and their comparison with the routine pattern, which appears as an orange spot under 365 nm UV light (Rf: 0.31), in two of the four varieties studied. For the Boconó and Yu-62 varieties, this flavonoid's presence was not detected; however, in the chromatographic profile, another spot with a possible flavonol nucleus appears with an Rf of 0.91, which was detected in all the varieties studied and which

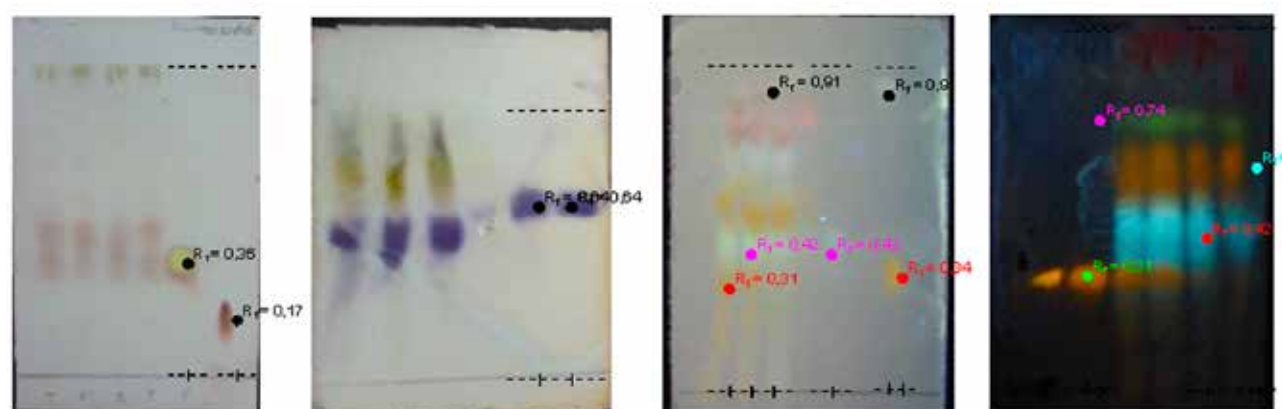


Figure 1. Chromatographic profile of the different metabolites detected in the four varieties under study.

I. Amino acids. (Táchira (T), Maracay (M), Boconó (B), Yu-62 (Y)) and control substance (L-proline (P), L-arginine (A)). Solvent system: n-butanol: acetone: acetic acid: water (35: 35: 10: 20) Detection system: ninhydrin in n-butanol

II. Carbohydrates (Táchira (T), Maracay (M), Boconó (B), Yu-62 (Y)) and control substance (L-proline (P), L-arginine (A)), and control substance (sucrose (S), glucose (G)). Solvent system: 2-propanol: n-butanol: water (12: 3: 4) Detection system: a-naphthol in sulfuric acid.

III and IV. Flavonoids. 1 and 2: Routine; 3: Táchira; 4: Maracay; 5: Boconó; 6: Yu-62; 7: chlorogenic acid; 8: gallic acid. Solvent system: ethyl acetate: formic acid: acetic acid: water (100: 11: 11: 10) Detection system: NP / PE

Varieties	AMINO ACID				PROTEIN		
	Free Proline	CV %	Average %	Average	Average Protein	CV%	Average
	Average mg/g		(MS)	mg/g (MS)	(mg/g)		%MS
	X±S				X±S		
Táchira	4,50±0,06 a	1,38	1,60 a	16,01	21,41±0,06 b	3,10	7,62
Maracay	1,96±0,10 c	4,97	0,70c	6,98	23,81±1,13 a	4,75	8,47
Boconó	4,39±0,22 a	4,98	1,56 a	15,62	21,24±0,83 b	3,89	7,56
Yu-62	3,34±0,18 b	5,44	1,19 b	11,89	6,86±0,31 c	4,56	2,44

Legend: There is no data related to the quantification method used. X ± S = mean ± standard deviation; CV coefficient of variation.

Different letters indicate significant differences for P < 0.01.

Table 1. Concentration of free proline and proteins present in leaves of the varieties of *Morus alba L.*

Varieties	SOLUBLE CARBOHYDRATES			TOTAL PHENOLS						
	Carbohydrates	CV	Average	Soluble	CV	Linked to the	CV	Total phenols	CV	Average
	(mg/g)	%	% (MS)	(mg/g)	%	cell wall (mg/g)	%	(mg/g)	%	% (MS)
	X±S			X±S		X±S		X±S		
Táchira	51,59±1,06 ^c	2,06	18,36	8,48±0,35 ^a	4,17	13,71±0,60 ^b	4,38	22,19±0,49	2,21	7,90
Maracay	68,15±3,28 ^b	4,81	24,25	5,56±0,28 ^b	4,99	8,67±0,21 ^c	2,38	14,23±0,16	1,12	5,06
Boconó	76,23±3,88 ^a	5,09	27,13	5,35±0,16 ^b	3,03	17,60±0,90 ^a	5,14	22,96±0,77	3,36	8,17
Yu-62	68,61±3,0 ^b	4,90	24,42	5,12±0,26 ^b	5,02	18,89±0,92 ^a	4,89	24,01±0,95	3,97	8,54

Legend: The content of total phenols was calculated from the sum of the parameters quantified individually for each variety and replica. X ± S = mean ± standard deviation; CV coefficient of variation. Different letters indicate significant differences for P < 0.05 for soluble carbohydrates and P < 0.01 for total phenols.

Table 2. Concentration of carbohydrate and phenolic compounds in leaves of the of *Morus alba L* varieties.

Routine quantification by HPTLC			IC ₅₀ values found for the varieties and for the routine standard in ppm (mg / L, µg / mL)	
Varieties	Average Routine	CV %	Average IC ₅₀	CV %
	(mg/g) X±S			
Táchira	0,87±0,01 ^b	1,41	553,68±3,23 ^d	0,58
Maracay	1,36±0,06 ^a	4,06	1054,01±1,76 ^c	0,17
Boconó			1398,93±2,23 ^b	0,16
Yu-62			3817,89±18,08 ^a	0,47
Patrón Rutina			5,25±0,05	0,90

Legend: X ± S = mean ± standard deviation; CV coefficient of variation. Different letters indicate significant differences for P < 0.01.

Table 3. Routine concentration and anti-radical activity of the varieties.

could be associated with the presence of gallic acid. In the same way, intense white fluorescence spots were detected for all varieties, one of them with an Rf: 0.45, which refers to the possible presence of chlorogenic acid. Quercetin could be associated with a yellow stain with an Rf value of 0.74 observed in all the studied varieties, but with a lower intensity in the Boconó and Yu-62 varieties.

Quantification of amino acids (free L-proline) and proteins

For different varieties of *Morus alba* cultivated in Cuba, Martín et al.25 have indicated the presence of the 20 essential amino acids and that of them L-proline, valine, arginine and leucine were the most abundant, with quantitative differences between them; but the L-proline values were around 2.13% DM (dry mass).

The increase in the concentration of amino acids and L-proline is an indicator to evaluate plants' stress state because, in these conditions, they tend to accumulate free amino acids as a defense mechanism, reducing protein synthesis.

The results achieved the % (DM) values of L-proline below those obtained for the Cuban varieties (table 1), with the Maracay variety being the lowest value. Regarding the comparison between them, the analysis of variance and the tests of means obtained allowed to observe significant differences of the Táchira and Boconó varieties for Yu-62 and Maracay for $P < 0.01$.

Proteins are essential factors for studies related to the nutritional contribution of forage species for animal feed. Plants of the genus *Morus* have a high protein content (14-28% on a dry basis)^{25,31-32}, making them an exciting alternative in the agricultural area.

In the analyses carried out for the mulberry varieties, low protein values were reached (Table 1), comparable with those found in the Cuban varieties evaluated by Cáceres *et al.*³³, which obtained values close to the Maracay, Boconó, and Táchira varieties. According to the variance analysis and the test of means, significant differences could be observed $P < 0.01$ between them, the Maracay being the one that presented the highest protein concentration and the Yu-62 the lowest.

Different authors have pointed out the influence of some factors on protein variability in the genus *Morus*. Some consider that the highest crude protein values depend on the regrowth age and the time of year²⁵, while others have outlined the influence of climatic conditions and the use of fertilizers^{30,32,34-36}. In this case, it is considered that when the plants were in the greenhouse, it could have affected the regrowth age and the non-use of fertilizers.

Quantification of soluble carbohydrates and total phenols

Carbohydrates are the metabolites found in greater quantity in plants, playing an essential role since they provide the necessary energy for the various vital functions in which they participate, mention the formation and growth of tissues, and be associated with recovery plant after pruning. The photosynthetic process mediates the source of soluble carbohydrates in the plant; therefore, environmental factors such as access to water, leaf surface (size of the leaves), and temperature, among other factors, play an essential role³⁷⁻³⁹.

The fact that the studied varieties were in a greenhouse where the incident radiation was necessary, together with a cool environment provided by the non-direct interaction with other plants and a constant watering during the analysis period, allows the studied varieties in the nursery phase they carry out their photosynthetic process efficiently, being evidenced by the size of the leaves despite not observing a great leaf mass.

The variety with the highest concentration of carbohydrates was Boconó, while Táchira had the lowest value (Table 2). The analysis of variance showed significant differences for $P < 0.01$ between the varieties.

Generally, as a product of their normal secondary metabolism, all plants can biosynthesize a high number of phenolic compounds, some of which are essential for their physiological functions and others are useful to defend themselves against stressful situations (water, light,)^{10,40}.

In the results obtained (table 2), the highest concentrations of this metabolite belong to the category of phenols linked to the cell wall in which the environmental conditions to which the species are subjected will have a direct impact. Being under the same conditions, the response obtained is characteristic of each variety.

Soluble phenols had the lowest concentrations, which can be associated with defense against pathogenic organisms that directly affect the internal cell system, as shown in some reports in the literature⁴¹⁻⁴³.

The variance analysis and the test of means showed highly significant differences ($P < 0.01$) between the varieties for soluble phenols. The highest concentration was obtained in Táchira, while the others behaved statistically similar among them. In the case of phenols bound to the cell wall, there were significant differences between varieties; the Yu-62 and Boconó cultivars presented the highest values and surpassed Táchira and Maracay, a similar behavior to each other.

Routine HPTLC Quantification and Anti-Radical Activity

According to Polumackanycz¹⁰, rutin, quercetin, and apigenin are the main bioactive phenolic compounds present in mulberry leaves. Flavanols are the ones that contribute the most to the antioxidant activity in the leaves of the *Morus alba* species (Flaczyk *et al.*⁴⁴), the most representative compound being rutin (quercetin-3-rutinoside). In the qualitative tests carried out by TLC, rutin could not be visualized in the Boconó and Yu-62 varieties.

The values obtained for Táchira and Maracay are shown in table 3. Significant differences were observed for $P < 0.01$ between the two varieties, with Maracay presenting the highest value. The concentrations found were low compared to those published in the bibliography^{41,44-45}, although the climatic conditions develop differently from the study object, which influences the results.

Regarding anti-radical activity, the highest IC_{50} is the one corresponding to the lowest activity value. It was to be expected that the trend that should be seen in the antioxidant activity would be the same visualized for the content of total phenols; however, the results obtained showed different trends in which the contribution of other metabolites present in some of the varieties could influence, whose synergistic or summative effect contributed to the results found. The analysis of variance showed highly significant differences ($P < 0.01$) between the varieties.

Some authors^{46,47} have reported distinct IC_{50} values for varieties of the genus *Morus*, but in the comparison between these and the results obtained, the analysis conditions, the type of extract (extraction method and solvent used), the concentration of DPPH used, and reaction time, among many others.

However, the differences between the varieties studied, where the agroecological conditions are the same, are used, maybe due to each variety's intrinsic characteristics.

A joint analysis of the four varieties allowed to establish that the Táchira variety presented the highest content of amino acids (L-proline), soluble phenols, and anti-radical activity; the Maracay variety exhibited the highest protein content and Boconó the highest concentration of carbohydrates, so each of them can be used depending on the objective to be pursued: for animal or therapeutic feeding purposes.

Conclusions

The analysis of the four varieties allowed to establish that the Táchira variety presented the highest content of amino acids (L-proline), soluble phenols, and anti-radical activity; the Maracay variety exhibited the highest protein content and Boconó the highest concentration of carbohydrates, so each of them can be used depending on the objective to be pursued: for animal or therapeutic feeding purposes.

Acknowledgment

To the Institute for Advanced Studies (IDEA). Venezuela; to the Faculty of Sciences. Chemistry School of the Central University of Venezuela and the Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) facilities.

Competing Interests

Authors have declared that no competing interests exist.

Authors' Contributions

DSC, MR, and RARS: They contributed the concepts or ideas, design, definition of the intellectual content, data analysis, and revision of the manuscript.

JJQM and YJRA: carried out the bibliographic search, experimental studies, data acquisition, statistical analysis, and manuscript preparation.

MMM: participated in data analysis and editing and final revision of the manuscript.

Bibliographic references

1. Benavides J. Manejo y utilización de la morera (*Morus alba*) como forraje. *Agroforestería de las Américas*. 1995; 2(7). Obtained from: <http://www.fao.org/3/a-x6306s.pdf>. Consulted: 9-10-2019
2. Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R, Simons A. Agroforestry tree Database: a tree reference and selection guide version 4.0. 2009. Obtained from: http://www.worldagroforestry.org/treedb2/AFTPDFS/Morus_alba.pdf Consulted: 9-10-2019.
3. Medina M, García D, Moratino P, Cova L. La morera (*Morus* Spp.) como recurso forrajero: avances y consideraciones de investigación. *Zootecnia Trop*. 2009; 27(4): 343-362.
4. Cholo F y Delgado H. Formación de callos en el cultivo de la morera (*Morus alba* L.). Tesis. Universidad de Granma. Facultad de Ciencias Agrícolas. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. 2011. Obtained from: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/946/1/T-UTC-1242.pdf> Consulted: 9-10-2019.
5. Blanco M, Sierra M. Caracterización bromatológica y evaluación de diferentes niveles de inclusión de morera (*Morus alba* L.) y sauco (*Sambucus nigra* L.), en la alimentación de conejos en ceba. Universidad de la Salle. Facultad de zootecnia. Bogotá. 2005. 27-29, 34-36. Obtained from: <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/6651/00797701.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Consulted: 9-10-2019.
6. García, Noda Y, Medina M, Martín G, Soca M. Morera: una alternativa viable para los sistemas de alimentación animal en el trópico. *Rev. AIA* 2006; 10(1) 55-72.
7. Chan EW, Lye PY, Wong SK. Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*. *Chin J Nat Med*. 2016; (1): 17-30. doi: 10.3724 / SP.J.1009.2016.00017.
8. Negro C, Aprile A, De Bellis L, Miceli A. Nutraceutical Properties of Mulberries Grown in Southern Italy (Apulia). *Antioxidantes (Basilica)*. 2019; 8 (7). pii: E223. doi: 10.3390 / antiox8070223.
9. Wu SC, Han F, Song MR, Chen S, Li Q, Zhang Q, Zhu K, Shen JZ. Natural Flavones from *Morus alba* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* via Targeting the Proton Motive Force and Membrane Permeability. *J Agric Food Chem*. 2019; 67(36):10222-10234. doi: 10.1021/acs.jafc.9b01795.
10. Polumackanycz M, Sledzinski T, Goyke E, Wesolowski M, Viapiana A. A Comparative Study on the Phenolic Composition and Biological Activities of *Morus alba* L. Commercial Samples. *Moléculas*. 2019; 24 (17). pii: E3082. doi: 10.3390 / moléculas24173082.
11. Prausová N, Kollár P. Prenylated phenols with cytotoxic and antiproliferative activity isolated from *Morus alba*. *Ceska Slov Farm*. 2019; 68 (2): 48-68.
12. Mahboubi M. *Morus alba* (mulberry), a natural potent compound in management of obesity. *Pharmacol Res*. 2019; 146: 104341. doi: 10.1016 / j. phrs.2019.104341.
13. Yuan Q, Zhao L. Mulberry (*Morus alba* L.) Fruit-A Review of Characteristic Components and Health Benefits. *J Agric Food Chem*. 2017; 65 (48): 10383-10394. doi: 10.1021 / acs.jafc.7b03614.
14. Jiao Y, Wang X, Jiang X, Kong F, Wang S, Yan C. Antidiabetic effects of *Morus alba* fruit polysaccharides on high-fat diet- and streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. *J Ethnopharmacol*. 2017; 199:119-127. doi: 10.1016 / j.jep.2017.02.003.
15. Paudel P, Seong SH, Zhou Y, Ha MT, Min BS, Jung HA, Choi JS. Arylbenzofurans from the Root Bark of *Morus alba* as Triple Inhibitors of Cholinesterase, β -Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1, and Glycogen Synthase Kinase-3 : Relevance to Alzheimer's Disease. *ACS Omega*. 2019;4(4):6283-6294. doi: 10.1021/acsomega.9b00198.
16. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976; 72(1-2): 248-254. doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3
17. DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Smith F. Método de Dubois calorimétrico para la determinación de azúcar y sustancias relacionadas. *Química analítica* 2002; 28 (3): 350-356. doi: 10.1021 / ac60111a017.
18. Teijon, J, Garrido A, Blanco D, Villaverde C, Mendoza C, Ramírez J. Fundamentos de bioquímica estructural. Editorial Tebar. Madrid. España. p 67-69. 2006.
19. Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2002; 10:178-182. ISSN: 1021-9498.
20. Pourmorad F, Hosseinimerhr SJ, Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*. 2006; 5(11):1142-1145. ISSN 1684-5315
21. Di Rienzo, Casanoves F, Balzarini M, González L, Tablada M, Robledo C. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Obtained from: <http://www.infostat.com.ar>. Consulted: 9-08-2019
22. Soca M, Ojeda F, García DE y Soca M. Efecto del forraje de *Morus alba* en los indicadores productivos y de salud de bovinos jóvenes en pastoreo. *Pastos y Forrajes*. 2010, 33 (4):1-10. ISSN 0864-0394.
23. Mora-Valverde D. Usos de la morera (*Morus alba*) en la alimentación del conejo. el rol de la fibra y la proteína en el Tracto digestivo. *Agronomía Mesoamericana* 2010, 21(2):357-366. ISSN: 1021-7444
24. Zeng ZJ, Iang J, Yu J, Mao X, Yu B, Chen D. Effect of dietary supplementation with mulberry (*Morus alba* L.) leaves on the growth performance, meat quality and antioxidative capacity of finishing pigs. *Journal of Integrative Agriculture* 2019, 18(1): 143-151. doi: 10.1016/S2095-3119(18)62072-6.
25. Martín GJ, Noda Y, Pentón G, García DE; García F, González E, Ojeda F, Milera M, López O, Ly J, Leiva L y Arece J. La morera (*Morus alba*, Linn.): una especie de interés para la alimentación animal. *Pastos y Forrajes* 2007, 30(5) ISSN 0864-0394.
26. Xirui H, Jiacheng F, Yinlan R, Xiaoxiao W, Yin S, Ni W, Zefeng Z, Yu Ch, Ning N, Hao G, Linhong H. Structures, bioactivities and future prospective of polysaccharides from *Morus alba* (white mulberry): A review. *Food Chemistry* 2018, 245:899-910
27. Yang Y, Zhang T, Xiao L, Yang L, Chen R. Two new chalcones from leaves of *Morus alba* L. *Fitoterapia* 2010, 81(6):614-616. doi: 10.1016/j.fitote.2010.03.005
28. Huang QH, Lei Ch, Wang PP, Li JY, Li J, Ho AJ. Isoprenylated phenolic compounds with PTP1B inhibition from *Morus alba*. *Fitoterapia*. 2017, 122:138-143. doi: 10.1016/j.fitote.2017.09.006.
29. Zhang H, Li M, Wang MM, Wang XN, Shen T, Wang SQ, Ren DM. Antioxidant flavan derivatives from the leaves of *Morus alba*. *Phytochemistry Letters*. 2019, 29: 84-90. doi: 10.1016/j.phytol.2018.11.002.
30. Pesqueira J. Cambios bioquímicos, morfológicos y ecofisiológicos en plantas del género *Lotus* bajo estrés salino. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biología Vegetal. 2008. Obtained from: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/5765/tesisUPV3030.pdf>. Consulted: 10-09-2019

31. Benavides J. Utilización de la Morera en sistemas de producción animal. Conferencia electrónica de la FAO sobre "Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica". Obtained from: http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/agrof_or1/Bnvdcs12.htm. Consulted: 11-10-2019
32. Noda, Y, Martín, G.; Machado, R. Rendimiento y calidad bromatológica de *Morus alba* cosechada a diferentes alturas y frecuencias de defoliación. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 2007; 41(4):363-369. ISSN: 0034-7485.
33. Cáceres O, González E. Valor nutritivo de árboles, arbustos y otras plantas forrajeras para los rumiantes. *Pastos y Forrajes* 2002, 25:15-20. fihal-01190060f
34. Boschini FC, Dormond H., Castro H, Composición química de la morera (*Morus alba*), para uso en la alimentación animal: densidades y frecuencias de poda. *Agronomía Mesoamericana*. 2000, 11(1):41-49. ISSN: 1021-7444 pccmca@cariari.ucr.ac.cr
35. Hurtado DI, Nocua S, Narváez-Solarte W, Vargas-Sánchez JE. Valor nutricional de la morera (*Morus sp.*), matarratón (*Gliricidia sepium*), pasto indio (*Panicum máximum*) y arboloco (*Montanoa quadrangularis*) en la alimentación de cuyes (*Cavia porcellus*). *vet. Zootec* 2012, 6(1): 56-65.
36. García Soldevilla F y Fernández R. Influencia de la frecuencia de poda y la época sobre los rendimientos de biomasa de la morera (*Morus alba*). *Revista Computadorizada de Producción Porcina* 2004, 11(1):64-74.
37. Yepes A; Silveira Buckeridge M. Respuestas de las plantas ante los factores ambientales del cambio climático global (Revisión) *Colombia Forestal* 2011, 14(2):213-232. ISSN: 0120-0739
38. Pérez-Urria E. Fotosíntesis: Aspectos Básicos. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2009, 2 (3): 1-47. ISSN: 1989-3620
39. Azcón-Bieto J, Fleck I, Aranda X Y Gómez-Casanovasuria N. Fotosíntesis, factores ambientales y cambio climático. 2013. Obtained from: <http://biblio3.url.edu.gt/Publi/Libros/2013/FisioVegetal/13.pdf>. Consulted: 11-10-2019.
40. Chen XY., Zhang T., Wang X., Hamann T., Kang J., Yu DQ., Chen RY. A chemical investigation of the leaves of *Morus alba* L. *Molecules*. 2018; 23:1018. doi: 10.3390 / molecules23051018.
41. Radojkovic M, Zekovic Z, Vidovic S, Kocar D, Mascovic P. Free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus spp.* L., Moraceae) extracts. *Hem. Ind.* 2012, 66 (4):547-552.
42. Memon A, Memon M, Luthria D, Bhangar M, Pitafi A. Phenolic acid profiling and antioxidant potential of mulberry (*Morus laevigata* W., *Morus nigra* L., *Morus alba* L.) leaves and fruits grown in Pakistan. *Pol. J. Food. Nutr. Sci.* 2010, 60(1):2532.
43. García D, Ojeda F. Evaluación de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de *Morus alba* (Linn.) II. Polifenoles totales. *Pastos y forrajes*. 2004, 27(1): 59-64.
44. Flaczyk E, Kobus-Cisowska J, Przeor M, Korczak J, Remiszewski M, Korbas E, Buchowski M. Chemical characterization and antioxidative properties of Polish variety of *Morus alba* L. leaf aqueous extracts from the laboratory and pilot-scale processes. *Agricultural Sciences* 2013, 4(5B):141-147 doi:10.4236/as.2013.45B026
45. Yu WT, Kwon OC, Kim HB, Sung GB, Kim HW, Kim YS Qualitative and quantitative analysis of flavonoids from 12 species of Korean mulberry leaves. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids from 12 species of Korean mulberry leaves. *J. Food Sci. Technol.* 2018; 55:1789-1796. doi: 10.1007 / s13197-018-3093-2.
46. Ali MK, Abdu AR, Islam S, Khandokhar P, Parvin S, Badrul MI, et al., A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts from different parts of *Morus alba* L. (Moraceae) *BMC Res Notes*. 2013; 6:24. doi: 10.1186 / 1756-0500-6-24
47. Farahani M, Salehi-Arjmand H, Khadivi A, Akramian M. Chemical characterization and antioxidant activities of *Morus alba* var. *nigra* fruits. *Scientia Horticulturae*. 2019. 253:120-127. doi: 10.1016/j.scienta.2019.04.040.

Received: 20 noviembre 2020

Accepted: 20 enero 2021

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Assessing the predatory activity of *Arthrobotrys oligosporus* strain C-2197 as biocontrol of the root-knot nematode *Meloidogyne* spp.

Adela Quevedo¹, Marcos Vera-Morales¹, Fernando Espinoza-Lozano¹, Rafael F. Castañeda-Ruiz², Daynet Sosa^{1,2}, Freddy Magdama^{1,2*}

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.22

Abstract: The root-knot nematode, *Meloidogyne* spp., is an endoparasite that infects plants' root system and causes yield losses in several important crops. *Meloidogyne* is one of the most devastating pests, so searching for effective biological agents is needed to mitigate its damage. In this study, the predatory activity of *Arthrobotrys oligosporus* Fresen strain C-2197, obtained from a tropical dry forest of Ecuador, was evaluated as a biocontrol alternative for root-knot caused by *Meloidogyne* spp. Our results showed that *A. oligosporus* C-2197 has predatory activity against juvenile nematodes, 72.31%, and 79% efficacy, for *in vitro* and greenhouse conditions. Besides, the studied strain showed growth-promoting activity, increasing leaf and root area of inoculated plants. Growth promoting activity was also observed in field tests. The present study validates the potential use of *A. oligosporus* as a biocontrol of *Meloidogyne* spp. in tomato production systems under greenhouse. It also presents useful information on the use of different cultivation media and substrates for massive *A. oligosporus* spore concentrates.

Key words: *Arthrobotrys oligosporus*, *Meloidogyne*, biocontrol, root system.

Introduction

Phytoparasitic nematodes are considered one of the greatest threats to agriculture worldwide, with estimated losses exceeding \$100 billion per year¹. Nematodes of the genus *Meloidogyne* are the essential phytoparasitic pathogens from an economic and scientific standpoint^{2,3} as they can affect more than 2,000 species of plants⁴, including cultivars of enormous food importance^{5,6}. Previous studies have described 100 species belonging to the genus *Meloidogyne*⁷, of which *M. incognita*, *M. javanica*, *M. hapla* and *M. arenaria* have been reported in Ecuador^{8,9}, causing damage on more than 25% of the horticultural yield production of the country¹⁰.

The management of *Meloidogyne* spp. is cumbersome as different reproductive strategies allow this species to adapt quickly to a wide range of temperatures and environments¹¹. This group's high diversity and the intensive crop production practices exacerbate their incidence and facilitate their dispersal across fields^{12,13}. These nematodes attack exposed roots by modifying their structure and growth, causing the formation of giant cells due to nutrient uptake¹⁴, which translates, sometimes in a short time, into low yield¹⁵.

With the growing advance of agriculture, chemical pesticides were developed¹⁶ to overcome this problem. However, their frequent use has caused several side effects, affecting soil health by reducing biological activity¹⁷. Another concern about pesticides is the risk they pose to human health, including infections, malignancies, lung inflammation, and others^{18,19}. New regulations regarding the use of these chemicals continue to be enforced by international agencies to help alleviate the negative effect of their use in farmers' lives²⁰. In this regard, the search for alternatives to mitigate the effect of nematodes less environmentally damaging and safer for human use is highly encouraged. Among those, biological control agents are a feasible option for pest management²¹. Examples clearly have shown that controlling agents can reduce root-knot nematode populations and damage levels²² up to 45% compared to un-

controlled conditions²³.

Within the gamma of antagonistic microorganisms, nematophagous fungi outstand this activity on trapping and devouring nematodes using specialized structures that allow them to penetrate the cuticle's nematode to grow inside, utterly killing them^{24,25}. Although their habitat is the soil, these fungi can change their lifestyle from saprophytic to pathogenic once they contact the nematode^{26,27}. Some reported modes of action include the development of specialized traps such as constriction rings, non-constriction rings, adhesive knobs, adhesive nets, and adhesive columns^{28,29}. Some more specialized species, such as *Arthrobotrys oligosporus*, can even produce volatile compounds to attract their prey until the mycelial traps are ready to function correctly, which in some cases, can take more than twelve hours to form³⁰.

A. oligosporus grows in soil, around roots, and animal feces³¹, but found particularly in nematode-infested soils³². This fungus has significantly reduced pathogen populations³³. It has been extensively studied under laboratory and semi-controlled and open field conditions in tomato production^{34,35}. Thus, the search for new strains of *A. oligosporus* with similar or better nematophagous activity can help develop new products for controlling *Meloidogyne* spp. in Ecuador to improve tomato's local production. This study's objective was to evaluate the predatory activity of *A. oligosporus* strain C-2197 against the root-knot nematode *Meloidogyne* spp.

Methods

A. oligosporus strain C-2197 was isolated from decomposing leaves collected at the site of Santa Rosa, El Oro province (Ecuador), in a forest adjacent to a coffee plantation with limited anthropogenic activity. The samples were collected in plastic bags and taken to the laboratory, where they were placed in humid chambers for fifteen days^{36,37}. After the isolation and

¹ Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Guayaquil, Ecuador.

² Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias de la Vida, Guayaquil, Ecuador.

³ Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura (INIFAT), Tropical 'Alejandro de Humboldt', OSDE, Grupo Agrícola, C. Habana, Cuba.

identification of this fungus using taxonomic keys, monoconidial colonies were obtained for later use. *A. oligosporus* C-2197 was deposited in the Microorganism Culture Collection of the Biotechnology Research Centre of Ecuador (CIBE) with the code CCMCIBE-H481. To maintain the predatory activity of our strain, the colonies were kept in cornmeal agar media (CMA)³⁸.

For this study, the initial population of *Meloidogyne* spp. was obtained from tomato plants of the Granja Agrícola Experimental (GEA) located in the Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). To maintain the nematode population, hybrid ABM-135 tomato plants were infected and kept in the greenhouse.

The growth of *A. oligosporus* C-2197 was evaluated in six different culture media: water agar, v-8 juice agar, corn meal agar (CMA), carrot agar, cornmeal + carrot agar, and oat agar. Radial growth was measured every 24 hours up to eight days. During this time, the Petri dishes were incubated at 28°C. Then, spore counts were performed in solutions obtained after scraping the colonies' surfaces with 5 ml of sterile water. The number of spores was calculated using a Neubauer camera. The experiment included five replicates per treatment.

To evaluate the predatory effect of *A. oligosporus* C-2197 under laboratory conditions, ten egg masses of *Meloidogyne* spp. were placed in Petri dishes with water agar. After 24 hours from the juvenile nematodes' appearance, 1 ml of spore solution of *A. oligosporus* C-2197, previously adjusted to 1×10^6 cfu/ml, was poured into each Petri dish. This trial included the evaluation of ten replicas (Petri dishes) placed at ambient temperature. After 24 hours of incubation, the number of live, dead, static, parasitized, and non-parasitized nematodes were evaluated.

To assess the effect of *A. oligosporus* C-2197 under greenhouse conditions, three-week old ABM-135 hybrid tomato plants were inoculated with ten egg masses of *Meloidogyne* spp. four days before placing the spore suspensions (1×10^6 cfu/ml) of the biocontrol. For this experiment, spore suspensions were obtained from colonies growing on a natural fiber substrate. The experiment was conducted following a completely randomized block design with four plants per treatment with four replicates (N=48), including T1 - *A. oligosporus* (AOL); T2 - Chemical control (NQ), and T3 - Water (CONTROL). Nematode root infection was evaluated by counting the number of egg masses and determining root-knot damage³⁹. Response variables included plant height, stem diameter, fresh and dry weight of the plant, fresh and dry weight of the roots.

Finally, the effect of *A. oligosporus* C-2197 was also evaluated in small field plots. Tomato plants previously infected with ten egg masses of *Meloidogyne* spp. and then planted in

the field were treated with 1 L of a spore solution (1×10^6 cfu/ml) of *A. oligosporus* C-2197 sprayed directly on a "Bio-cover" (made of banana fiber woven with straw from rice) (Figure. 1 A-B). The experiment included plants treated with a commercial product and negative control for proper comparison. In total, 10 plants were evaluated per treatment for six weeks following a completely randomized block design. Response variables included plant height, number of flowers and fruits.

Results

The radial growth experiment showed that *A. oligosporus* C-2197 has a differential growth response in all media evaluated (Figure. 2A). The fungus thoroughly colonized the Petri dishes' surface, in some cases, from the fifth day. Of the six media evaluated, the best results were observed with oatmeal and cornmeal agar + carrot agar, however, no significant differences were found (Figure 2B). Sporulation of *A. oligosporus* C-2197 was highly increased with significant differences ($p < 0.05$) in v8 juice agar and corn meal agar CMA. Spore count in these treatments was higher than 1×10^6 cfu/ml after nine days of mycelium growth. In contrast, the fungus produced fewer spores on water agar and carrot agar (Figure 2C).

The *in vitro* confrontation test revealed that *A. oligosporus* C-2197 had a control efficiency of 72.31% over the total number of nematodes exposed to the fungus. This percentage included dead and static nematodes (Figure. 3 A-B).

Control activity against *Meloidogyne* spp. was also observed in the greenhouse assay. Plants treated with *A. oligosporus* showed better root development than controls (Figure. 4) and significant differences in nematode egg mass reduction, with an effectiveness of 79%, compared to the negative control (Table 1). The plants' root health treated with *A. oligosporus* also correlated with the increase of plant height at the end of the experiment, which differed significantly from the controls (Figure. 5). Levels of root nematode infestation also differed among treatments. Plants treated with *A. oligosporus* and the commercial product showed less root-knot damage (values between 0-2) than the control (values 3-4), according to the qualitative scale used.

Field experiments also showed plants treated with *A. oligosporus* had better development (20 cm above control plants) (Table 2); however, there were no significant differences regarding the number of flowers and fruits produced by plants on each treatment.



Figure 1. (A) Inoculum production of *A. oligosporus* C-2197 in flasks under controlled conditions. (B) "Bio-cover" inoculated with *A. oligosporus* C-2197 surrounding hybrid tomato plants ABM 135 after 2 weeks of transplant in field plots.

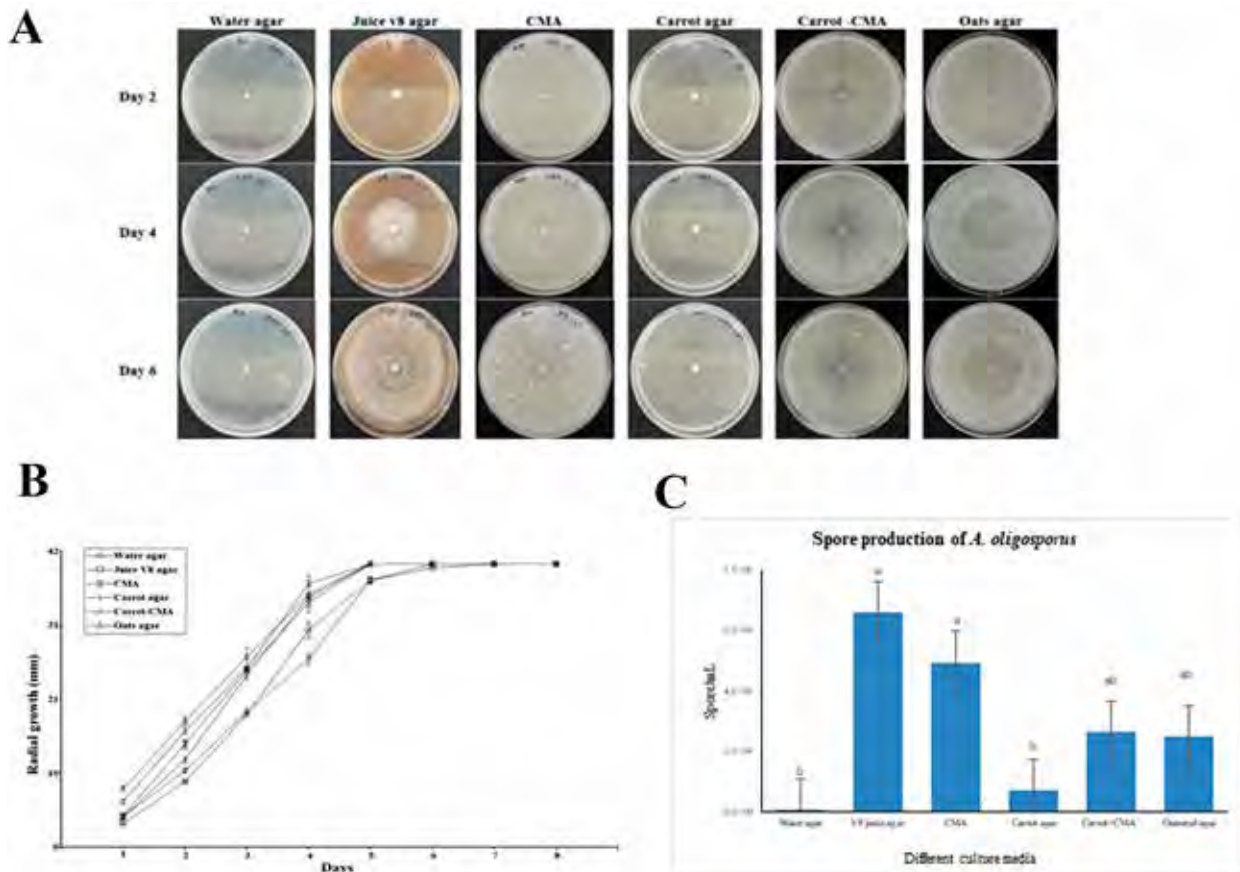


Figure 2. (A) Comparison of the growth of *A. oligosporus* C-2197 in different media, evaluated on the second, fourth and sixth day. (B) Radial growth of *A. oligosporus* C-2197 cultivated in six different media cultures: water agar, v-8 juice agar, corn meal agar CMA, carrot agar, cornmeal + carrot agar, and oatmeal agar. (C) Spore production of *A. oligosporus* C-2197 on different culture media.

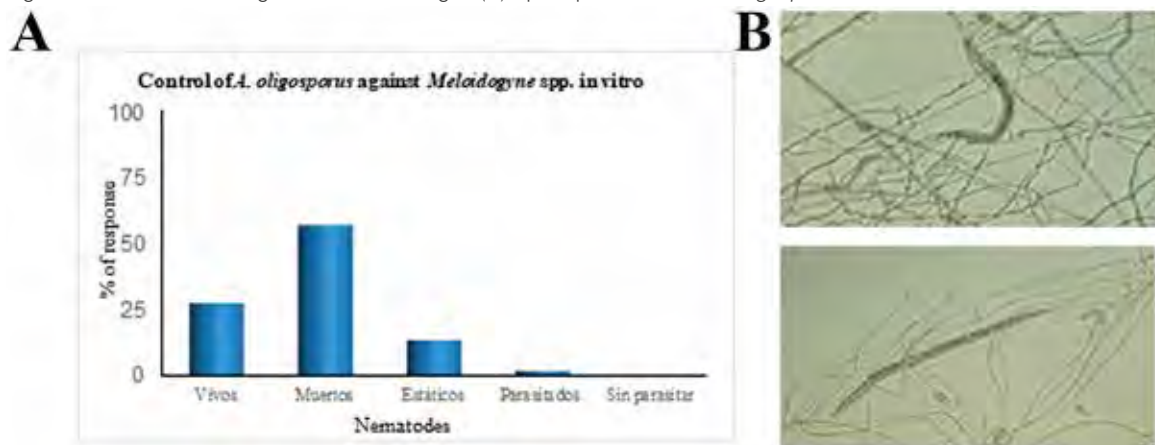


Figure 3. (A) Response percentage of the application of *A. oligosporus* against the nematode *Meloidogyne* spp. under *in vitro* conditions. (B) Nematodes trapped in three-dimensional webs of *A. oligosporus* C-2197

Treatment	Parameters						
	Fresh shoot weight (g)	Dry shoot weight (g)	Fresh root weight (g)	Dry root weight (g)	Root height (cm)	Numbers of egg mass/plant	Gall index (0-10) ^A
1 AOL	136,40 ± 6,12 ^A	21,73 ± 0,92 ^A	22,40 ± 1,73 ^A	2,73 ± 0,19 ^A	42,13 ± 1,78 ^A	23,93 ± 2,95 ^A	1,0 ± 0,1 ^A
2 NQ	78,38 ± 5,93 ^B	11,06 ± 0,89 ^B	15,44 ± 1,68 ^B	2,13 ± 0,19 ^{AB}	38,56 ± 1,72 ^{AB}	42,75 ± 2,86 ^A	1,8 ± 0,1 ^A
3 CONTROL	68,44 ± 5,93 ^B	10,25 ± 0,89 ^B	16,38 ± 1,68 ^B	1,88 ± 0,19 ^B	37,38 ± 1,72 ^B	113,63 ± 2,86 ^B	3,8 ± 0,2 ^B

^A Root-knot damage index on the scale from 0 = no galls to 10 = dead plant according to Bridge and Page (1980).
 Different letters in the same row indicate statistically significant differences according to Tukey test ($p < 0.05$); ± standard error.

Table 1. Effect of *A. oligosporus* on tomato plants inoculated with the root-knot nematode *Meloidogyne* spp. in greenhouse conditions.

Time	Treatment	Variables					
		Height (cm)		Number of flowers		Number of fruits	
Week 1	T1-AOL	81,61 ±	1,68 ^A	1,40 ±	0,31 ^A	0,17 ±	0,20 ^A
	T2-NQ	71,31 ±	1,62 ^B	1,94 ±	0,30 ^A	0,50 ±	0,20 ^A
	T3-CONTROL	76,13 ±	1,62 ^{AB}	2,19 ±	0,30 ^A	0,75 ±	0,20 ^A
Week 2	T1-AOL	98,63 ±	2,89 ^A	2,13 ±	0,38 ^A	0,44 ±	0,23 ^B
	T2-NQ	85,56 ±	2,80 ^B	3,00 ±	0,36 ^A	1,06 ±	0,22 ^{AB}
	T3-CONTROL	92,06 ±	2,80 ^{AB}	2,88 ±	0,36 ^A	1,38 ±	0,22 ^A
Week 3	T1-AOL	105,62 ±	3,39 ^A	1,71 ±	0,51 ^A	1,37 ±	0,23 ^A
	T2-NQ	92,38 ±	3,28 ^B	2,81 ±	0,50 ^A	2,13 ±	0,22 ^A
	T3-CONTROL	97,19 ±	3,28 ^{AB}	2,50 ±	0,50 ^A	1,81 ±	0,22 ^A
Week 4	T1-AOL	112,55 ±	3,66 ^A	2,14 ±	0,35 ^A	2,42 ±	0,25 ^{AB}
	T2-NQ	96,31 ±	3,54 ^B	2,56 ±	0,34 ^A	3,13 ±	0,24 ^A
	T3-CONTROL	100,69 ±	3,54 ^{AB}	2,38 ±	0,34 ^A	2,19 ±	0,24 ^B
Week 5	T1-AOL	120,67 ±	3,87 ^A	1,35 ±	0,34 ^A	3,36 ±	0,36 ^A
	T2-NQ	99,25 ±	3,74 ^B	1,06 ±	0,33 ^A	3,75 ±	0,35 ^A
	T3-CONTROL	103,63 ±	3,74 ^B	1,88 ±	0,33 ^A	2,63 ±	0,35 ^A
Week 6	T1-AOL	127,44 ±	4,07 ^A	1,69 ±	0,36 ^A	3,63 ±	0,38 ^A
	T2-NQ	104,88 ±	3,93 ^B	0,63 ±	0,35 ^A	4,25 ±	0,37 ^A
	T3-CONTROL	109,00 ±	3,93 ^B	1,31 ±	0,35 ^A	3,13 ±	0,37 ^A

Different letters in the same row indicate statistically significant differences according to Tukey test ($p < 0.05$); ± standard error; * control

Table 2. Evaluation of *A. oligosporus* C-2197 on some physiological and agronomic traits of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants hybrid ABM 135

Discussion and Conclusions

In the present study, laboratory, greenhouse, and field tests were conducted to assess the activity of *A. oligosporus* C-2197 as a biocontrol for *Meloidogyne* spp. The in vitro tests showed that *A. oligosporus* C-2197 grew differently depending on the type of medium used, similar to previous reports^{40,41}. Our results are also consistent with previous work on the predatory activity of *A. oligosporus* controlling second instar juveniles of *Meloidogyne* spp. This fungus specializes in the formation of capture nets and demonstrates the ability to attract nematodes⁴²⁻⁴⁵ and the production of toxins that paralyze the movement of juveniles⁴⁶.

Greenhouse tests confirmed the control activity of *A. oligosporus* C-2197 on the nematode population studied. This strain also showed growth-promoting activity for root development and leaf area. These data coincide with previous findings

also reporting growing stimulus of plants after been treated with *A. oligosporus*, increasing production on tomato, rice, and carrot crops^{23,34,47-49}. Laboratory results showed that *A. oligosporus* C-2197 could develop well in substrates with high carbon and nitrogen ratios related to its saprophytic lifestyle, a necessary feature to establish in the soil outperform other saprophytic competitors^{50,51}. This characteristic facilitates the search for cheap substrates that can be implemented for massive scale production of a commercial product based on this strain⁵².

In the present study, the application of *A. oligosporus* to the soil did not significantly affect nematode populations. More extensive field trials with *A. oligosporus* C-2197 are needed, as the "Bio-cover" may have affected the control of the fungus' efficacy. Evidence shows the efficacy of *A. oligosporus* to trap nematodes can vary when conditions are too variable⁵³⁻⁵⁵.

In conclusion, it was demonstrated that *A. oligosporus*

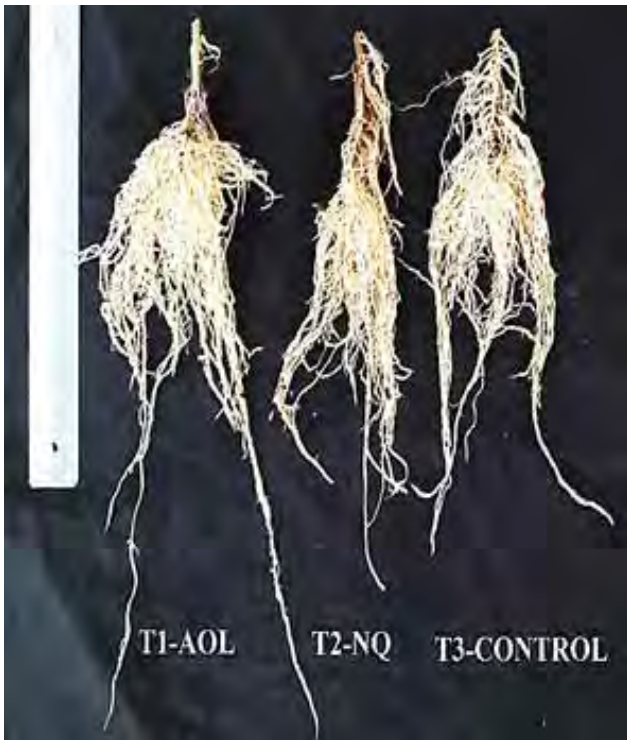


Figure 4. Greenhouse tests results. Evaluation of the root system.

C-2197 showed significant efficacy in controlling nematodes in the laboratory and greenhouse, capable of reducing the target nematode population. Besides, *A. oligosporus* C-2197 had growth-promoting activity on tomato plants. This study shows the potential use of *A. oligosporus* C-2197 for *Meloidogyne* spp.'s biocontrol, specifically as a management alternative for tomato production in greenhouse conditions.

Acknowledgment

The authors are grateful to Dr. María Isabel Jiménez for the technical guidance to isolate nematodes from plants. The project supported this research "Isolation, identification and characterization of beneficial microorganisms associated with cocoa cultivation and their potential as biological control agents" from Milagro State University - UNEMI.

Bibliographic references

1. Brennan RJB, Glaze-Corcoran S, Wick R, Hashemi M. Biofumigation: An alternative strategy for the control of plant parasitic nematodes. *Journal of Integrative Agriculture*. 2020 Jul 1;19(7):1680-90.
2. Jones JT, Haegeman A, Danchin EGJ, Gaur HS, Helder J, Jones MGK, et al. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 2013;14(9):946-61.
3. Sivasubramaniam N, Hariharan G, Zakeel MCM. Sustainable management of plant-parasitic nematodes: an overview from conventional practices to modern techniques. In: Ansari RA, Rizvi R, Mahmood I, editors. *Management of phytonematodes: Recent advances and future challenges* [Internet]. Singapore: Springer; 2020 [cited 2020 Sep 7]. p. 353-99. Available from: https://doi.org/10.1007/978-981-15-4087-5_16
4. Čepulytė R, Danquah WB, Bruening G, Williamson VM. Potent attractant for root-knot nematodes in exudates from seedling root tips of two host species. *Scientific Reports*. 2018 Jul 18;8(1):10847.
5. Moens M, Perry RN, Starr JL. *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry RN, Starr JL, Moens M, editors. *Root-knot nematodes*. CABI International, Wallingford, Oxon (CABI); 2009. p. 1-17.
6. Santos MFA dos, Mattos V da S, Monteiro JMS, Almeida MRA, Jorge AS, Cares JE, et al. Diversity of *Meloidogyne* spp. from peri-urban areas of sub-Saharan Africa and their genetic similarity with populations from the Latin America. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2019 Jan 1;105:110-8.
7. Elling AA. Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species. *Phytopathology*. 2013;103(11):1092-102.
8. Eguiguren R. Avances de investigación sobre el género *Meloidogyne* en Ecuador. In: *Ambato-Ecuador: INIAP*; 1982. p. 171-85.
9. Mendoza D, Jarama F, Cuenca E, Ribera R, Navarrete B, Cañarte E. Efecto de cuatro láminas de riego y *Meloidogyne* spp. sobre características agronómicas y de rendimiento de tomate de mesa *Solanum lycopersicum* L. *Revista de la Universidad del Zulia*. 2019 Nov 3;10(26):37-57.



Figure 5. Foliar development of tomato plants inoculated with *Meloidogyne* spp. and treated with *A. oligosporus* (center), commercial product (right), and control (left).

10. Mwageni W, Blok V, Daudi A, Bala G, Davies K, Netscher C, et al. The importance of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and factors affecting the utility of *Pasteuria penetrans* as a biocontrol agent. *Nematology*. 2000 Jan 1;2(8):823–45.
11. Giné A, López Gómez M, Vela MD, Ornat C, Talavera M, Verdejo Lucas S, et al. Thermal requirements and population dynamics of root-knot nematodes on cucumber and yield losses under protected cultivation. *Plant Pathology*. 2014;63(6):1446–53.
12. Ali N, Tavoillot J, Chapuis E, Mateille T. Trend to explain the distribution of root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. associated with olive trees in Morocco. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2016 Jun 1;225:22–32.
13. Karszen G, Wesemael WML, Moens M. Root-knot nematodes. In: Perry RN, Moens M, editors. *Plant Nematology*. Wallingford, UK: CAB International; 2013. p. 73–108.
14. Lu W, Wang X, Wang F, Liu J. Fine root capture and phenotypic analysis for tomato infected with *Meloidogyne incognita*. *Computers and Electronics in Agriculture*. 2020 Jun 1;173:105455.
15. López-Gómez M, Flor-Peregrín E, Talavera M, Sorribas FJ, Verdejo-Lucas S. Population dynamics of *Meloidogyne javanica* and its relationship with the leaf chlorophyll content in zucchini. *Crop Protection*. 2015 Apr 1;70:8–14.
16. Fráguas RM, Costa VA, Terra WC, Aguiar AP, Martins SJ, Campos VP, et al. Toxicities of 4,5-Dihydroisoxazoles against root-knot nematodes and in silico studies of their modes of action. *J Agric Food Chem*. 2020 Jan 15;68(2):523–9.
17. Prasad BDN, Subramanyam B, Lakshminpathi RN, Ansari RA, Rizvi R, Sumbul A, et al. Utilization of beneficial microorganisms in sustainable control of phytonematodes. In: Ansari RA, Rizvi R, Mahmood I, editors. *Management of phytonematodes: Recent advances and future challenges* [Internet]. Singapore: Springer; 2020 [cited 2020 Sep 8]. p. 317–37. Available from: https://doi.org/10.1007/978-981-15-4087-5_14
18. Souza GDS, Costa LCA da, Maciel AC, Reis FDV, Pamplona Y de AP. Presence of pesticides in atmosphere and risk to human health: a discussion for the Environmental Surveillance. *Cien Saude Colet*. 2017 Oct;22(10):3269–80.
19. Vrijheid M, Casas M, Gascon M, Valvi D, Nieuwenhuijsen M. Environmental pollutants and child health—A review of recent concerns. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2016 Jul 1;219(4):331–42.
20. FAO. Food and agriculture organization of the United Nations. [Internet]. Codex Pestic Residues in Food Online Database. 2019 [cited 2020 Nov 11]. Available from: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/en/>
21. Moosavi MR. Efficacy of microbial biocontrol agents in integration with other managing methods against phytoparasitic nematodes. In: Ansari RA, Rizvi R, Mahmood I, editors. *Management of phytonematodes: Recent advances and future challenges* [Internet]. Singapore: Springer; 2020 [cited 2020 Sep 8]. p. 229–58. Available from: https://doi.org/10.1007/978-981-15-4087-5_10
22. Hahn MH, May De Mio LL, Kuhn OJ, Duarte H da SS. Nematophagous mushrooms can be an alternative to control *Meloidogyne javanica*. *Biological Control*. 2019 Nov 1;138:104024.
23. Peiris PUS, Li Y, Brown P, Xu C. Fungal biocontrol against *Meloidogyne* spp. in agricultural crops: A systematic review and meta-analysis. *Biological Control*. 2020 May 1;144:104235.
24. Jiang X, Xiang M, Liu X. Nematode-Trapping Fungi. *Microbiol Spectr*. 2017;5(1).
25. Vidal-Diez de Ulzurrun G, Hsueh Y-P. Predator-prey interactions of nematode-trapping fungi and nematodes: both sides of the coin. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018 May;102(9):3939–49.
26. Kumar D, Maurya N, Kumar P, Singh H, Addy SK. Assessment of germination and carnivorous activities of a nematode-trapping fungus *Arthrobotrys dactyloides* in fungistatic and fungicidal soil environment. *Biological Control*. 2015 Mar 1;82:76–85.
27. Wang B-L, Chen Y-H, He J-N, Xue H-X, Yan N, Zeng Z-J, et al. Integrated metabolomics and morphogenesis reveal volatile signaling of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. Drake HL, editor. *Appl Environ Microbiol*. 2018 May 1;84(9):e02749-17.
28. Yang Y, Yang E, An Z, Liu X. Evolution of nematode-trapping cells of predatory fungi of the Orbiliaceae based on evidence from rRNA-encoding DNA and multiprotein sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 May 15;104(20):8379–84.
29. Su H, Zhao Y, Zhou J, Feng H, Jiang D, Zhang K-Q, et al. Trapping devices of nematode-trapping fungi: formation, evolution, and genomic perspectives. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2017 Feb;92(1):357–68.
30. Hsueh Y-P, Gronquist MR, Schwarz EM, Nath RD, Lee C-H, Gharib S, et al. Nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* mimics olfactory cues of sex and food to lure its nematode prey. Hobert O, editor. *eLife*. 2017 Jan 18;6:e20023.
31. Kumar N, Singh RK, Singh KP. Occurrence and colonization of nematophagous fungi in different substrates, agricultural soils and root galls. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2011 Jul 1;44(12):1182–95.
32. Niu X-M, Zhang K-Q. *Arthrobotrys oligospora*: a model organism for understanding the interaction between fungi and nematodes. *Mycology*. 2011 Jun 1;2(2):59–78.
33. Hiep NV, Ha NT, Thuy TTT, Toan PV. Isolation and selection of *Arthrobotrys* nematophagous fungi to control the nematodes on coffee and black pepper plants in Vietnam. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2019 May 9;52(7–8):825–43.
34. Singh UB, Sahu A, Sahu N, Singh RK, Renu S, Singh DP, et al. *Arthrobotrys oligospora*-mediated biological control of diseases of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) caused by *Meloidogyne incognita* and *Rhizoctonia solani*. *Journal of Applied Microbiology*. 2013;114(1):196–208.
35. Mostafanezhad H, Sahebani N, Zarghani SN. Control of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) with combination of *Arthrobotrys oligospora* and salicylic acid and study of some plant defense responses. *Biocontrol Science and Technology*. 2014 Feb 1;24(2):203–15.
36. Ellis MB. *Dematiaceae*. Kew, Commonwealth Mycological Institute.; 1971. 608 p.
37. Seifert K, Morgan-Jones G, Gams W, Kendrick B. *The Genera of Hyphomycetes*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre; 2011. 997 p.
38. Duddington CL. Notes on the technique of handling predacious fungi. *Transactions of the British Mycological Society*. 1955 Jun 1;38(2):97–103.
39. Bridge J, Page SLJ. Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart. *Tropical Pest Management*. 1980 Sep 1;26(3):296–8.
40. Belder E, Jansen E. The influence of temperature, nutrition, light and the growth time of the mycelium on capture and infection of *Meloidogyne hapla* by *Arthrobotrys oligospora*. *Fundamental and Applied Nematology*. 1994;17(1):57–66.
41. Cardoso ER, Assis LC, Nahas E. Nutrição e crescimento do fungo nematófago *Arthrobotrys oligospora*. *Summa Phytopathologica*. 2009 Dec;35(4):267–72.
42. Jansson H-B, Nordbring-Hertz B. Attraction of nematodes to living mycelium of nematophagous fungi. *Microbiology*. 1979;112(1):89–93.
43. Saxena G, Dayal R, Mukerji KG. Interaction of nematodes with nematophagous fungi: induction of trap formation, attraction and detection of attractants. *FEMS Microbiol Ecol*. 1987 Dec 1;3(6):319–27.
44. Yang J, Wang L, Ji X, Feng Y, Li X, Zou C, et al. Genomic and proteomic analyses of the fungus *Arthrobotrys oligospora* provide insights into nematode-trap formation. *PLOS Pathogens*. 2011 Sep 1;7(9):e1002179.
45. Hussain M, Maňasová M, Zouhar M, Ryšánek P. Comparative virulence assessment of different nematophagous fungi and chemicals against northern root-knot nematodes, *Meloidogyne hapla*, on carrots. *PJZ*. 2019;52(1).
46. Bird J, Herd RP. In vitro assessment of two species of nematophagous fungi (*Arthrobotrys oligospora* and *Arthrobotrys flagrans*) to control the development of infective cyathostome larvae from naturally infected horses. *Veterinary Parasitology*. 1995 Jan 1;56(1):181–7.

47. Gray NF. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. *Biological Reviews*. 1987;62(3):245–304.
48. Singh UB, Sahu A, Singh RK, Singh DP, Meena KK, Srivastava JS, et al. Evaluation of biocontrol potential of *Arthrobotrys oligospora* against *Meloidogyne graminicola* and *Rhizoctonia solani* in Rice (*Oryza sativa* L.). 2012;60(3):262–70.
49. Hussain M, Zouhar M, Rysanek P. Potential of some nematophagous fungi against *Meloidogyne hapla* infection in Czech Republic. *PJZ*. 2016 Oct 2;49(1):35–43.
50. Jaffee BA. Wood, nematodes, and the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Soil Biology and Biochemistry*. 2004 Jul 1;36(7):1171–8.
51. Nguyen V, Bastow J, Jaffee B, Strong D. Response of nematode-trapping fungi to organic substrates in a coastal grassland soil. *Mycol Res*. 2007 May 13;111(Pt 7):856–62.
52. Lee J-K, Kim D-G, Lee S-B. Nutritional requirements and mass production of nematode-trapping fungus, *Arthrobotrys oligospora*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 2004 Oct 1;7(3):325–9.
53. Galper S, Eden LM, Stirling GR, Smith LJ. Simple screening methods for assessing the predacious activity of nematode-trapping fungi. *Nematologica*. 1995 Jan 1;41(1–4):130–40.
54. Jaffee BA. Correlations between most probable number and activity of nematode-trapping fungi. *Phytopathology*. 2003 Dec;93(12):1599–605.
55. Jaffee BA. Do organic amendments enhance the nematode-trapping fungi *Dactylellina haptotyla* and *Arthrobotrys oligospora*? *J Nematol*. 2004 Sep;36(3):267–75.

Received: 2 december 2020

Accepted: 25 january 2021



RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Genomic benchmarking studies reveal variations of the polyubiquitination domain of the PSD95 protein in *Homo neanderthalensis* and other primates of the Hominidae family: Possible implications in cognitive functions?

Michael Suarez-Chamba¹, Luis Puma¹, Jorge Bermeo¹, Eugenio Andrade¹, Stalin A. Bermúdez-Puga¹ & Leopoldo Naranjo-Briceño^{1,2*}

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.23

Abstract: Modern humans' unique cognitive abilities regarding Neanderthals and other primate's lineages are frequently attributed to the differences in brain size development and evolution. However, recent studies have established the critical role of genomic and genetic benchmarking in analyzing the cognitive evolution between modern humans and primates, focused mainly on searching for involved genes in neurogenesis. PSD95 protein (named PSD95p) has a key role in modulating synaptic plasticity, learning, and memory skills. Thus, the present study aimed to determine the possible variations of the PSD95 gene between modern humans, Neanderthals, and other hominid primate species using bioinformatics tools. The results showed 14 polymorphisms compared with the contemporary human PSD95 gene, of which 13 were silent mutations, and only one was a non-silent mutation at the nucleotide position 281. Despite polymorphisms found at the nucleotide sequences, the PSD95p of humans and chimpanzees are 100% identical. Likewise, the gorilla and orangutan PSD95p are 100% identical, although a 103-amino acid deletion characterizes them at the N-terminal end (1-103), suggesting that it behaves like a non-functional protein. Interestingly, the single nucleotide polymorphism (SNP) found at position 281 in the Neanderthal PSD95 gene leads to a change of the E⁹⁴ to valine V⁹⁴ in the polyubiquitination domain (PEST) and variation in the three-dimensional structure of PSD95 protein. We prompt that this structural change in the PEST domain could induce a loss of PSD95p function and, therefore, an alteration in synaptic plasticity forms such as long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD). These findings open a possible hypothesis supporting the idea that humans' cognitive evolution after separating our last common ancestor with Neanderthals lineage could have been accompanied by discrete changes in the PSD95p polyubiquitination domain.

1593

Key words: Evolution, cognitive development, intelligence, memory, ARC gene, PES.

Introduction

Since our last common ancestor's divergence with Neanderthals, the early humans' evolution process, between 430,000 to 765,000 years ago¹⁻⁴, and with chimpanzees, between 4 to 7 million years ago^{5,6}, has become a subject of great controversy. One of the most relevant issues within this matter is precisely the interbreeding that humans and Neanderthals could have after migrated from Sub-Saharan Africa in two events. The first time carried out 100,000 years ago⁴ and the second time 50,000 years ago^{3,7-10}. Based on studies of fossil remains, it has been reported that the second interbreeding event allowed the introgression of around 6-9% of the Neanderthal genome into the early human genome^{4,7}. However, due to positive selection processes, a recent Asian and European genomes analysis has shown that the percentage of genetic segments introgressed from Neanderthal to human fell 1-3%^{3,7,11,12}.

The persistent Neanderthal genes in the genome of modern non-African humans are mainly those involved in phenotypic traits, directly influenced by the environment and other genes involved in both cognitive and skeletal development^{8,9}. Consequently, these genes have been linked to the expansion of modern humans throughout Europe, which subsequently led to the disappearance of Neanderthals 30,000 years ago^{8,13}. Nevertheless, it is evident that beyond a disappearance, Neanderthals were diluted in the early human genome.

On the other hand, despite the evolutionary processes in time and space between modern humans and chimpanzees,

unlike Neanderthals, it has been found that their genome is 98.7% identical^{5,6}. Despite their high identity percentage, likewise other hominids, chimpanzees also differ from modern humans in many morphological, behavioral, and cognitive characteristics⁵.

Modern humans' behavior and unique cognitive abilities concerning Neanderthals and other hominid primates have been attributed to the brain's evolution process^{5,14-18}. Several studies have suggested that the lower development of the brain's cranial capacity and organization could be the possible cause of the Neanderthal extinction^{14,18-20}. Based on these facts, it has been reported that the Neanderthal adaptive system was unable to survive the competitive environment with modern humans²⁰⁻²², therefore, emphasizing that modern humans had a more remarkable cognitive ability to develop adaptive strategies^{4,7}. However, a report described that the Neanderthals and modern humans had similar brain sizes, advocating that it is wrong to infer differentiated cognitive development between these two species based on archaeological data analysis²³. Recent studies reveal the importance of molecular biology and bioinformatics tools for the cognitive development investigation between modern humans and their common ancestors, which are focused mainly on the search of involved genes in neurogenesis, a mechanism associated with learning and memory developments^{6,18,24}. Therefore, it has been suggested that the evolutionary development of the brain is a direct cause of a more significant generation of neural

¹ Facultad de Ciencias de la Vida, Ingeniería en Biotecnología, Universidad Regional Amazónica Ikiám, Tena, Ecuador.

² Grupo de Microbiología Aplicada, Universidad Regional Amazónica Ikiám, Tena, Ecuador.

networks, hence the rounded form that has been attributed to the modern human brain compared with the elongated shape of the Neanderthal brain²⁴.

Likewise, it has been found that the regulation of genes involved in the migration and detrital development of neurons has led to a dissimilar functional development between the neurons of humans, chimpanzees, and bonobo¹⁸. *In-silico* analysis done in this work are not enough to confirm that the polymorphism of the PSD95 can be associated with neural networks. However, the results open a window to the scientific community because they allow knowing and infer a possible cause in the cognitive development differences between Neanderthals and modern humans and other primates.

It is known that the learning process through memory lies in the organization of neurons and their interactions²⁵. Memories are stored in a neuronal circuit by synapse mechanisms and specific neurons²⁶. Synaptic plasticity or dynamic changes of neuronal connections change the neuron's chemical composition and its capacity to communicate with its neighbors. Also, that allows the generation of new functional neurons (neurogenesis), contributing even more to plasticity²⁷. The me-

chanisms involved in synaptic plasticity changes are long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD), characterized by an increase and weakening of the synaptic force, respectively. Therefore, the favoring of LTP and the development of memory and learning have been associated with an increased expression of the PSD95 gene, which encodes a protein of postsynaptic density 95 (PSD95p) characteristic of an electro-dense region called postsynaptic density^{28,29}.

PSD95p is a specialized scaffold protein composed of several multiple protein interaction domains that include: i) a polyubiquitination domain (PEST), ii) three PDZ domains, iii) an SH3 domain, and iv) a guanylate kinase (GK)-like domain^{30,32}. PSD-95p is the best-studied protein of the guanylate kinase-associated membrane family (MAGUK)³⁰. Within this family, there are other scaffolding proteins such as SAP102, SAP97, and PSD93³². PSD95p with PSD93p can interact in postsynaptic sites to form a multimeric scaffold for grouping associated receptors, ion channels, and signaling proteins^{30,33,34}. As shown in Figure. 1, PSD95p is the anchoring axis of a complex of postsynaptic proteins, ion channels, and NMDA receptors (N-methyl-D-aspartate) and AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-

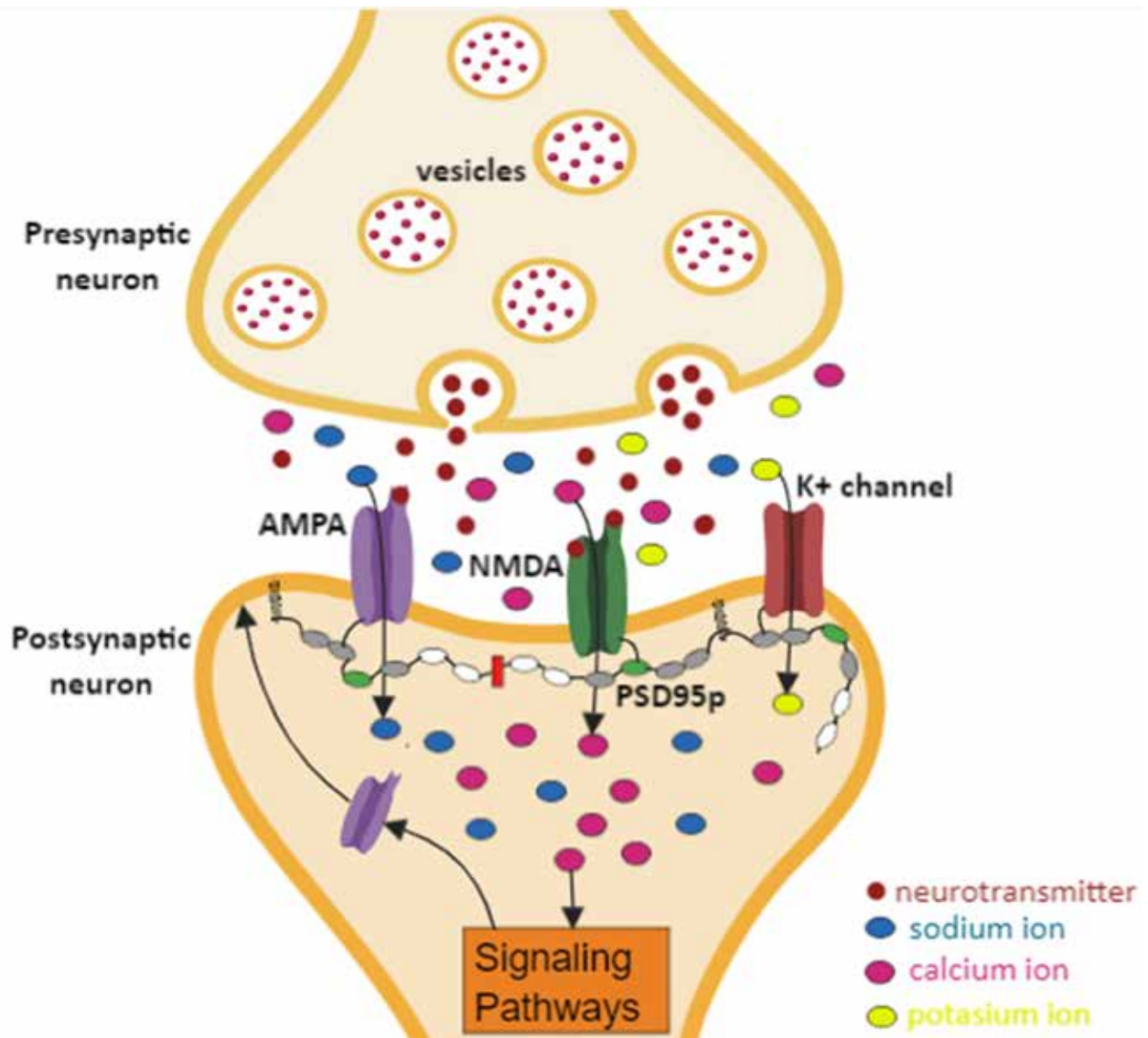


Figure 1. Interaction of PSD95p with AMPA and NMDA receptors. Generation of signaling pathways to increase the localization of AMPA receptors to the postsynaptic membrane; thus, inducing an increase of the strength of the synaptic connections between neighboring neurons.

methyl-4-acid isoxazole propionic) type. The presence of the NMDA and AMPA proteins is essential in the synaptic plasticity and cognitive functions development. However, their correct function will depend directly on the presence of PSD95p. For this reason, this study was only focused on the function of PSD95p, which plays an essential role in synaptic plasticity during LTP by allowing better localization of AMPA receptors in the synaptic membrane; thus, inducing an increase in the synaptic connections' strength between neighboring neurons³³⁻³⁷.

Experiments performed in mice have shown that mutations in the gene that encodes the PSD95 protein lead to a deficit in learning and memory abilities, abnormal social behavior, repetitive behaviors, increased stress, anxiety-related responses, and different motor alterations^{34,38}. In the case of mutations and erroneous genetic variants in the ARCP-PSD95p complex, it has been found that there may be a high susceptibility to schizophrenia, autism disorders, intellectual disabilities, epileptic mutations, and abnormal variants in intelligence^{33,39,40}. In future works, mutation analysis in the other proteins involved with cognitive development, such as ARCP, AMPA, and NMDA receptors, among others, will be elucidated.

In this research, we hypothesized that if in an evolutionary past, humans acquired specific variations in the nucleotide sequence of the PSD95 gene, then the structure and function of PSD95p, as well as the development of cognitive abilities, could have been improved compared to Neanderthals and other primates of the Hominidae family.

(Neanderthal), *Pan troglodytes* (Chimpanzee), *Pan paniscus* (Bonobo), *Gorilla gorilla* (Gorilla) and *Pongo abelii* (Orangutan). The PSD95 nucleotide (without introns) and PSD95p amino acid sequences of human, Chimpanzee, bonobo, gorilla, and orangutan were downloaded from the Ensembl Database⁴¹ and GenBank database⁴². The Neanderthal's nucleotide and amino acid sequences were downloaded from the Neanderthal Genome database⁴³, as shown in Tables 1 and 2.

Due to the present study's complexity, only one sequence was selected per Hominidae primate's species studied. However, in the case of Neanderthals, there is only one access to a sequenced genome in the Neanderthals Genome database.

In spite that this approach only uses one sequence by a specimen to make the comparison between species regarding PSD95 genes and proteins, it is useful to release scientific questions and hypothesis and to planning strong *in vivo* and *in vitro* experiments allowing to determine the relationships between variations of the polyubiquitination domain of the PSD95 protein and its possible implications in cognitive functions in Homo neanderthalensis and other primates of the Hominidae family, including modern human adequately.

Prediction of 3D protein structures

Prediction of the tertiary structure of human PSD5p was performed with Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0 (PHYRE2) server⁴⁵, which also allowed us to predict the 3D structure domains have not been crystallized previously. Prediction of the PSD5p 3D structures of Neanderthal, Chim-

Organism	Scientific name	Chromosome	Orienta tion	ID (%)	E- value	Accession	References
Human	<i>Homo sapiens</i>	17:7196755-7197052	Reverse	100	0	U83192.1	Stathakis, Hoover, You, and Bryant (1997)
Neanderthal	<i>Homo neanderthalensis</i>	17:7033933-7063745	Reverse	99.91	0	ENSG00000132535	The Neanderthal Genome Project - May 2010
Chimpanzee	<i>Pan troglodytes</i>	17:7450950-7451247	Reverse	99.83	0	XM_16931399.2	MODEL REFSEQ.
Bonobo	<i>Pan paniscus</i>	17:7214437-7214734	Reverse	99.48	0	XM_03810105.3	MODEL REFSEQ.
Gorilla	<i>Gorilla gorilla</i>	17:7202712-7203009	Reverse	99.67	0	XM_18913126.1	MODEL REFSEQ.
Orangutan	<i>Pongo abelii</i>	17:7210380-7210677	Reverse	99.17	0	XM_24234382.1	MODEL REFSEQ.

Table 1. General characteristics of the studied Hominidae primates PSD95 genes.

Organism	Scientific name	ID (%)	E- value	Accession	References
Human	<i>Homo sapiens</i>	100	0	AAC52113.1	Stathakis, Hoover, You, and Bryant (1997)
Neanderthal	<i>Homo neanderthalensis</i>	99.87	0	ENSG00000132535	The Neanderthal Genome Project - May 2010
Chimpanzee	<i>Pan troglodytes</i>	100	0	XP_016786888.1	MODEL REFSEQ.
Bonobo	<i>Pan paniscus</i>	99.61	0	XP_03810153.1	MODEL REFSEQ.
Gorilla	<i>Gorilla gorilla</i>	100	0	XP_018868671.1	MODEL REFSEQ.
Orangutan	<i>Pongo abelii</i>	100	0	XP_024090150.1	MODEL REFSEQ.

Table 2. General characteristics of the studied Hominidae primates PSD95 proteins.

The multiple sequence alignments were performed with the MUSCLE server directly linked to the Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, MEGA X 10.0.5⁴⁴

Materials and methods

Obtaining PSD95 sequences and multiple alignments

The primates selected for the present study were chosen based on the species belonging to the Hominidae clade, specifically: *Homo sapiens* (Human), *Homo neanderthalensis*

panzee, bonobo, gorilla, and orangutan was performed by SWISS-MODEL server⁴⁶ previous model generated for humans as a template. Finally, the models obtained were analyzed using PyMOL 2.3 software⁴⁷.

Phylogenetic trees

Two phylogenetic trees were built using nucleotide and amino acid sequences of the PSD95 gene and the PSD95p. The

evolutionary history was performed using MEGA X⁴⁸, the maximum likelihood method. Additionally, the Tamura-Nei model was used⁴⁹ for nucleotides and the model Le_Gascuel_2008⁵⁰ for amino acids. To increase the reliability of the analyzed taxa's consensus trees, a bootstrap corresponding to 2500 replicates was established⁵¹.

To decrease the construction complexity of the consensus tree that presents an optimal topology, the heuristic search method was used. For this, an initial tree was automatically obtained, applying the algorithms of Neighbor-Join and BioNJ to a matrix of distances by pairs estimated using the Maximum Composition Probability (MCL) approach, for the nucleotide sequences. The heuristic search's initial tree was obtained by applying the Neighbor-Joining method to a matrix of pairwise distances estimated using a JTT model. The analysis involved 6 nucleotide sequences and 6 amino acid sequences.

Results

Polymorphisms are found in the PEST domain of the PSD95 gene in Neanderthal and other primates of the Hominidae family

Despite the high percentage of identity (Table 1), the results obtained showed 14 polymorphisms along the PSD95 gene (Figure. 2A). The Neanderthal PSD95 gene is different from the human gene only by replacing one nucleotide at position 281 (A²⁸¹ by T²⁸¹). Simultaneously, the Chimpanzee is different from humans by substituting two nucleotides at positions 75 and 1503 (A⁷⁵ by C⁷⁵ and T¹⁵⁰³ by C¹⁵⁰³). The bonobo PSD95 gene is discriminated from humans by the substitution of 2 nucleotides at positions 75 and 1494 (A⁷⁵ by C⁷⁵ and T¹⁴⁹⁴ by C¹⁴⁹⁴) and by deletion of 9 nucleotides at positions 279-289 that are highly conserved in humans, Neanderthal, and Chimpanzee (5'...GAGTGMCA...3'). Gorilla and orangutan were the species that presented a lower percentage of identity with humans (99.67 and 99.17, respectively). This differentiation is related to the substitution of 5 and 8 nucleotides, respectively, and the deletion of 309 nucleotides in the 5'-end at positions 1-309 concerning the human, Neanderthal, Chimpanzee PSD95 genes.

Change of A²⁸¹ by T²⁸¹ in the Neanderthal PSD95 gene leads to alteration of Glu⁹⁴ to Val⁹⁴ in the PEST domain.

Interestingly, as is shown in Figure 2B, the alignments of amino acid sequences showed that, from the 14 polymorphisms shown above, 13 correspond to silent mutations. Only one mutation is a non-silent type, which was found in the Neanderthal PSD95 gene. This single nucleotide polymorphism (SNP), based on substitution of adenine by thymine at position 281, led to a change of the glutamate residue at position 94 (E94R) by a valine (V94R) in the Neanderthal PSD95 protein. Similarly, the deletion of the 9 nucleotides in bonobo led to a modification of 3 amino acids (E94R-L95R-Q96R), and the deletion of 309 nucleotides in gorilla and orangutan led to a deletion of 103 amino acids at the N-terminal end of the protein (position 1-103). On the other hand, the results indicate that, despite the polymorphisms found in the nucleotide sequences, the PSD95p protein from humans and chimpanzees are 100% identical. Likewise, gorilla and orangutan proteins do not show specific amino acid changes. An important fact is that overall substitutions and deletions from species studied were found in the PEST domain of PSD95p, as shown in Figure 2C.

The evolutionary history based on the PSD95p protein indicates that modern humans have a greater kinship with chimpanzees than with Neanderthals.

Using the maximum likelihood method, the evolutionary lineage concerning the PSD95 gene shows us the three clades' formation; the first one groups includes human, Neanderthal, and gorilla. In this clade, we can observe that humans have a greater kinship with Neanderthals than with gorillas (Figure. 3A). The second clade includes Chimpanzee and bonobo, and the third one only consists of the orangutan.

Regarding the PSD95p protein, three clades are obtained (Figure. 3B). However, because the polymorphisms found were non-silent mutations, except for Neanderthal, differences were observed in the first two clades described above for the phylogenetic tree regarding the species' PSD95 genes studied. Thus, a first clade was observed for humans and chimpanzees, a second clade for Neanderthals, bonobo, and gorilla, where Neanderthal has a greater kinship with bonobo. Finally, no differences were observed in the third clade formed by the orangutan.

Discussion

Proteins can fold in a specific way depending on the amino acids that constitute them until forming three-dimensional structures. Consequently, the function of a protein is directly related to its structure. Based on the results based on PSD95p sequences, we have shown that chimpanzees have a higher percentage of identity with modern humans. However, studies have shown that the cognitive differences between these two species are not governed solely by structural changes in gene products as proteins and gene expression levels are involved in the different cognitive processes.

On the other hand, due to the SNP found in the Neanderthal PSD95 gene, a change of glutamate © by valine (V) is generated, leading to a modification in the 3D conformational of the protein, as shown in Figure. 4A-B. Thus, we believe that the function of the PSD95 protein from Neanderthal was possibly affected, with a concomitant reduction in cognitive function compared with modern humans.

Likewise, as a consequence of the SNP found in the Neanderthal PSD95 gene, a change of glutamate © by valine (V) is generated, leading to a modification in the 3D conformational of the protein and therefore in its function (Figure. 4).

According to previous studies, a change of the glutamate amino acid within the PEST domain may lose its function. The synaptic strength depends on the AMPA and NMDA type receptors, regulated in part by the PSD95 protein, which seems depleted^{52,53}. Then, based on the conservation of the E94R-L95R-Q96R motif (Figure. 5), it could be thought that the modification in the E94R residue in Neanderthal could have induced a loss of function of the PSD95p protein. Likewise, the signal peptide's de-palmitoylation at the N-terminal end of the protein can weaken synaptic strength and lead to an LTD. This sequence of about 24 amino acids, found upstream of the PEST domain when undergoing a palmitoylation process in cysteine, serine, or threonine residues, allows PSD95p to be coupled postsynaptic membrane for subsequent anchoring of receptors and other signaling and adhesion proteins^{36,54,55}. Therefore, based on the mentioned above, it could be inferred that the deletion of the N-terminal end of 103 amino acids in the gorilla and orangutan protein may be, among other elements, a probable cause that they have less cognitive development than humans. Since PSD95p doesn't have a palmitoylation

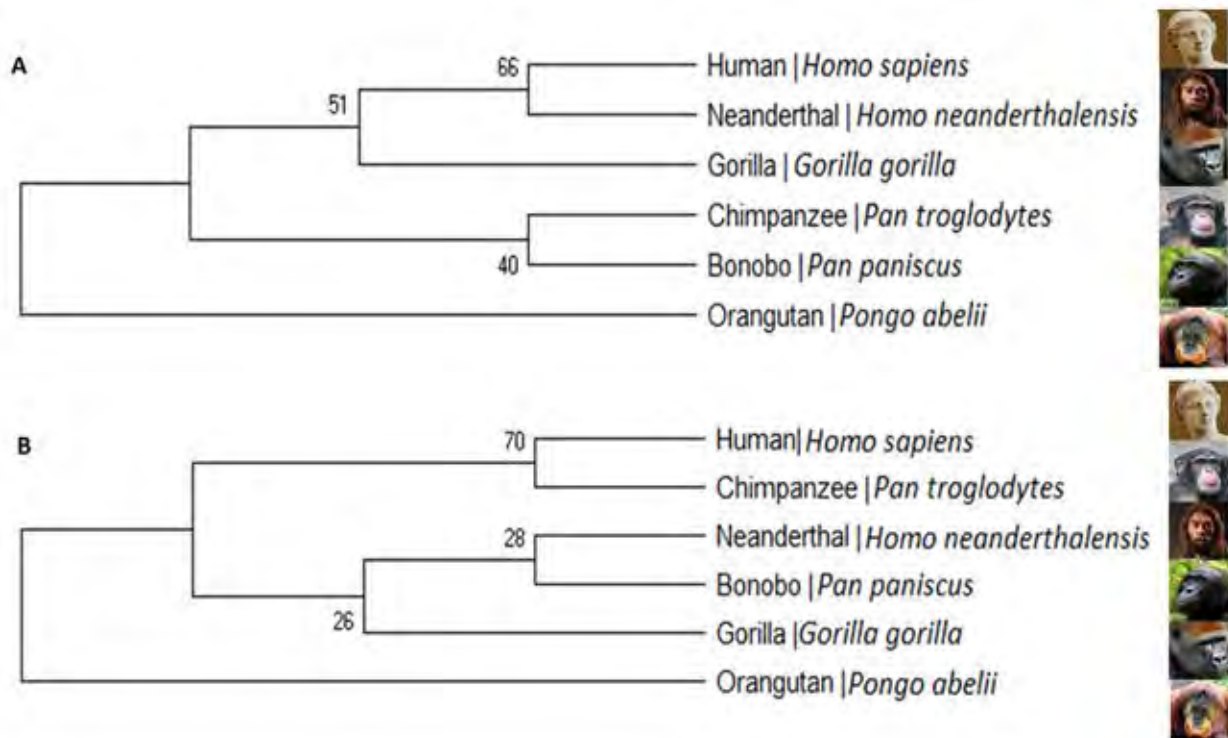


Figure 3. Evolutionary history of the Hominidae primate's family concerning the PSD95 gene and its encoded protein. (A) The genes' evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood method and the Tamura- Nei model. (B) The evolutionary history concerning the proteins was inferred by using the Maximum Likelihood method and Le_Gascuel_2008 model. The bootstrap consensus tree inferred from 2500 replicates both for genes and proteins represent the evolutionary history of the taxa analyzed. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. Percentages of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (2500 replicates) are shown next to the branches.

pathologies, such as depression, post-traumatic stress disorder, and stroke are generated⁶². Therefore, it is suggested that proteolysis by the proteasome of human PSD95p induced by polyubiquitination could act as a regulatory mechanism in the disengagement of AMPA receptors to decrease the flow of Ca²⁺ ions dependent on NMDA receptors (Figure. 6), favoring in this way the modulation of the synaptic force between neighboring neurons and so the increase of cognitive capacity.

Conclusions

In conclusion, these findings support the idea that the cognitive evolution of modern humans after the separation of our last common ancestor with Neanderthals and other hominid primates could have been accompanied by discrete changes in the domain of polyubiquitination of PSD95p, which has a crucial role in the modulation of synaptic plasticity and cognitive development. However, it should be considered that PSD95p is not the only protein involved in synaptic plasticity processes. Therefore, to verify our claims, it is necessary to perform *in vitro* and *in vivo* experiments to evaluate that the change of glutamate by valine at position 94 in the PEST domain could lead to the loss of the PSD95p functions and concomitant deterioration of cognitive development. The *in-silico* findings presented in this work are only the beginning and could open a window for future robust investigations.

Acknowledgment

We thank the excellent opportunity to study at the prestigious Universidad Regional Amazónica Ikiam. The authors

thank A. Naranjo, for your grammatical support.

Competing Interests

Authors declare there is no competing of interest

Bibliographic references

1. Arsuaga, J. L. et al. Neandertal roots: Cranial and chronological evidence from Sima de los Huesos. *Science* (80-.). 344, 1358–1363 (2014).
2. Prüfer, K. et al. The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature* 505, 43–49 (2014).
3. Enard, D. & Petrov, D. A. Evidence that RNA Viruses Drove Adaptive Introgression between Neanderthals and Modern Humans. *Cell* 175, 360–371.e13 (2018).
4. Kuhlwilm, M. et al. Ancient gene flow from early modern humans into Eastern Neanderthals. *Nature* 530, 429–433 (2016).
5. Enard, W. et al. Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns. *Science* (80-.). 296, 340–343 (2002).
6. Liu, X. et al. Extension of cortical synaptic development distinguishes humans from chimpanzees and macaques. *Genome Res.* 22, 611–622 (2012).
7. Fu, Q. et al. An early modern human from Romania with a recent Neanderthal ancestor. *Nature* 524, 216–219 (2015).
8. Green, R. E. et al. A draft sequence of the neandertal genome. *Science* (80-.). 328, 710–722 (2010).
9. Pääbo, S. The diverse origins of the human gene pool. *Nature Reviews Genetics* 16, 313–314 (2015).
10. Sankararaman, S., Patterson, N., Li, H., Pääbo, S. & Reich, D. The Date of Interbreeding between Neandertals and Modern Humans. *PLoS Genet.* 8, (2012).

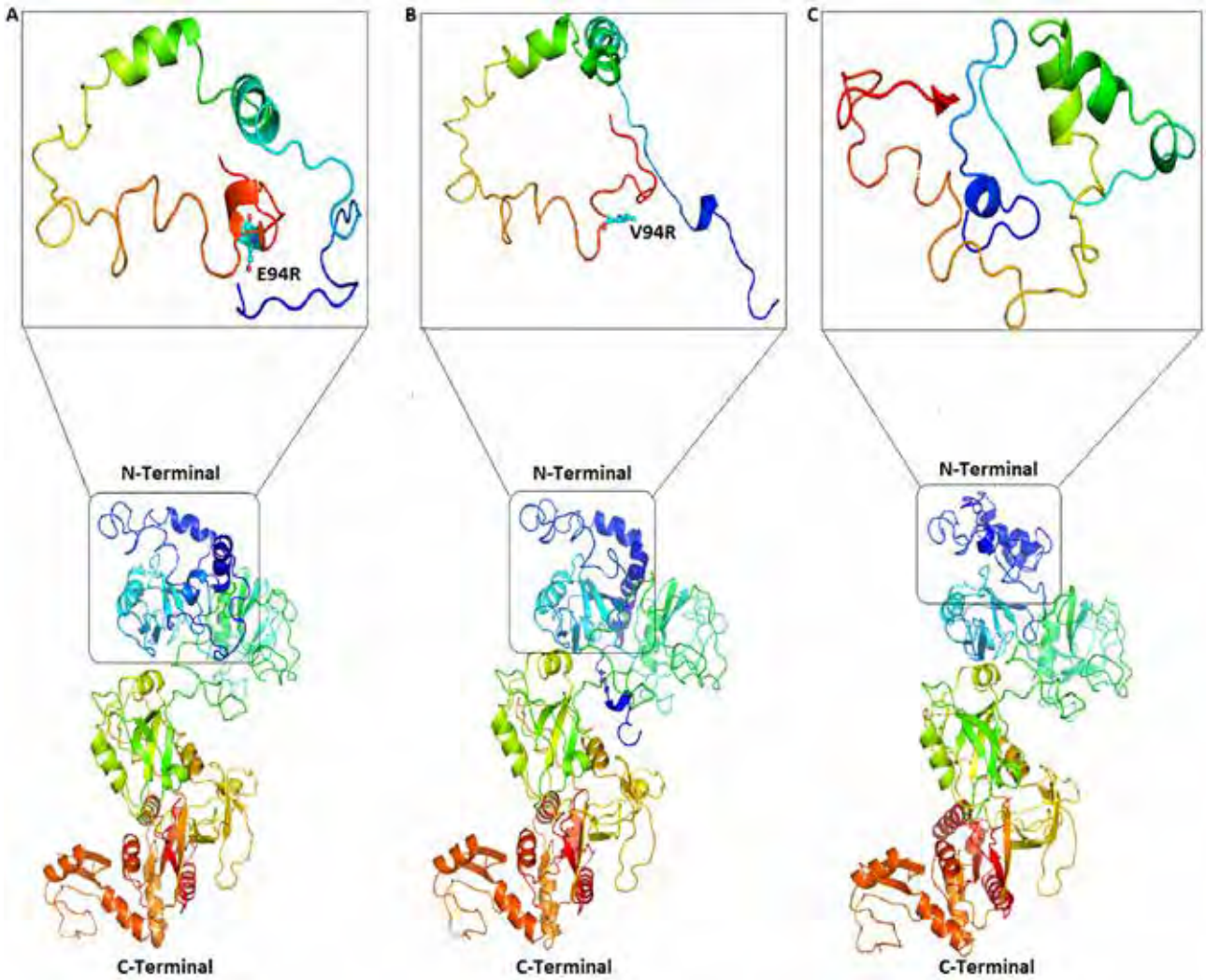


Figure 4. Conformational changes in the PSD95p three-dimensional structure. (A) Complete 3D structure prediction of human and chimpanzee proteins and the 3D structure of its N-terminus end are shown, indicating the glutamic amino acid E94 in balls and sticks figures. (B) Prediction of the 3D structure of the Neanderthal PSD95p shows that its N-terminal end differs from human protein. (C) The bonobo protein 3D structure is indicated, and, as well as the Neanderthal's, the N-terminal end diverges from human PSD95p.

	Q	K	Y	R	Q	D	E	D	T	P	P	L	E	H	S	P	A	H	L	P	N	Q	A	N	S	F	V	I	N	T	D	T	L	E	A	P	G	V	E	L	Q	V	N	G	T	E	G	E	M	E	V	I							
Human	Q	K	Y	R	Q	D	E	D	T	P	P	L	E	H	S	P	A	H	L	P	N	Q	A	N	S	F	V	I	N	T	D	T	L	E	A	P	G	V	E	L	Q	V	N	G	T	E	G	E	M	E	V	I							
Elephant	Q	K	Y	R	Q	D	E	D	T	P	P	L	E	H	S	P	A	H	L	P	N	Q	A	S	S	F	V	I	N	T	D	T	L	E	A	P	G	V	E	L	Q	V	N	G	T	E	G	E	M	E	V	I							
Rabbit	Q	K	Y	R	Q	D	E	D	T	P	P	L	E	H	S	P	A	H	L	P	N	Q	A	N	S	F	V	I	N	T	D	T	L	E	A	P	G	V	E	L	Q	V	N	G	T	E	G	E	M	E	V	I							
Mouse	Q	K	Y	R	Q	D	E	D	T	P	P	L	E	H	S	P	A	H	L	P	N	Q	A	N	S	F	V	I	N	T	D	T	L	E	A	P	G	V	E	L	Q	V	N	G	T	E	G	E	M	E	V	I							
Rat	K	K	Y	R	Q	D	E	D	T	P	P	L	E	H	S	P	A	H	L	P	N	Q	A	N	S	F	V	I	N	T	D	T	L	E	A	P	G	V	E	L	Q	V	N	G	T	E	G	E	M	E	V	I							
Dolphin	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	N	S	F	V	I	N	T	D	T	L	E	A	P	G	V	E	L	Q	V	N	G	T	E	G	E	M	E	V	I								
Dog	K	K	Y	R	Q	D	E	D	T	P	P	L	E	H	S	P	A	S	P	F	P	N	Q	A	N	S	F	V	I	N	T	D	T	L	E	A	P	G	-	-	-	V	N	G	T	E	G	E	M	E	V	I							
Koala	K	K	Y	R	Q	D	E	D	T	P	P	L	E	H	S	P	A	H	L	P	N	Q	A	N	S	F	V	I	N	T	D	T	L	E	A	P	G	V	-	-	-	V	N	G	T	E	G	E	M	E	V	I							
Turtle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	V	A	A	-	S	S	N	Q	A	N	P	F	I	L	N	T	D	A	L	T	P	G	-	-	-	V	N	G	D	A	D	Y	F	V		
Ostrich	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	T	I	P	S	T	I	L	P	-	Q	A	N	P	F	I	L	N	S	D	T	L	T	S	T	-	-	-	V	N	G	D	A	D	Y	F	V

Figure 5. Conserved motifs in the PEST domain of the N-terminal end of diverse macro vertebrate proteins. The red color indicates fully conserved motifs; the gray color indicates partially conserved motifs and, the yellow color indicates the non-conserved amino acids.

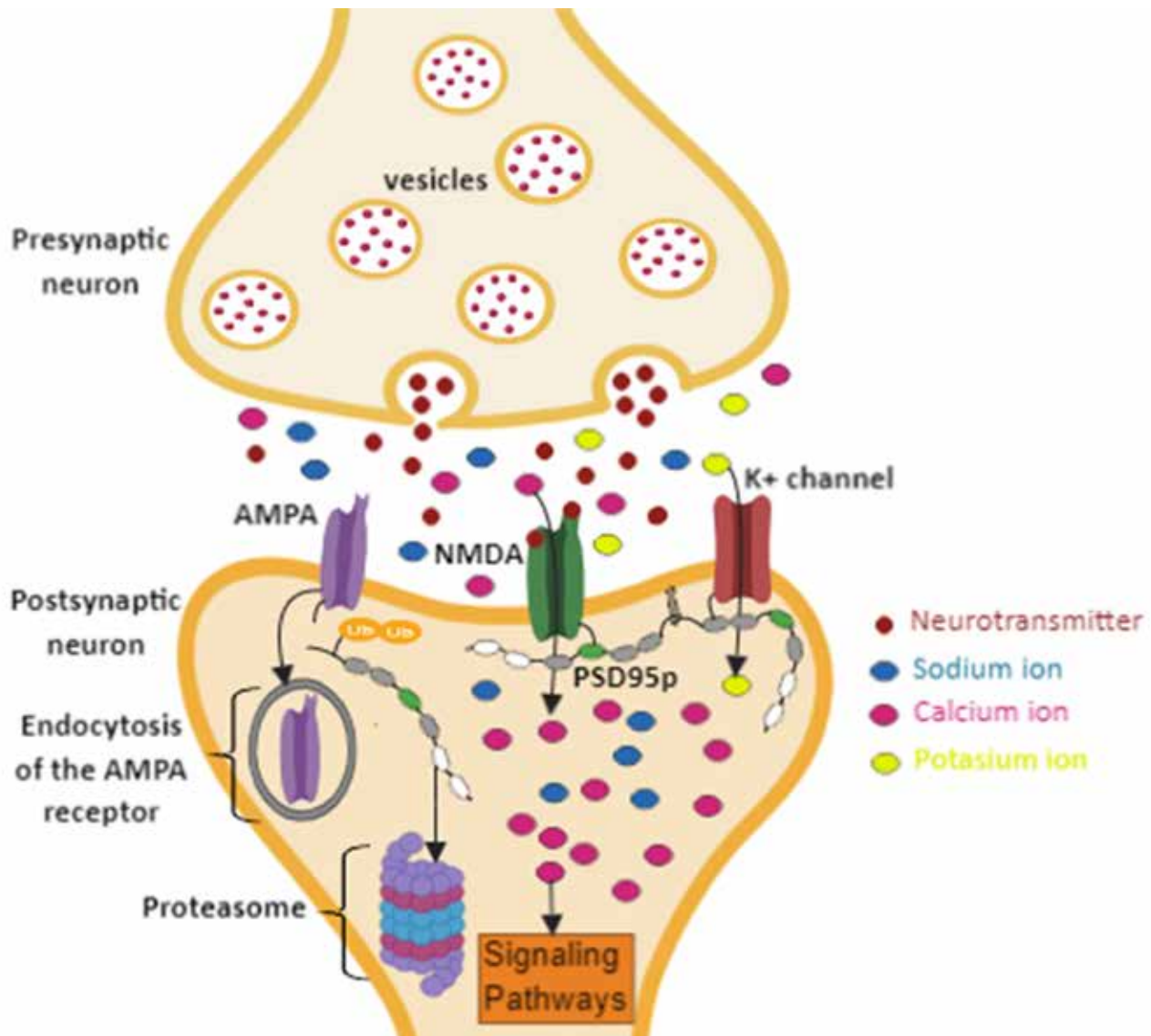


Figure 6. Regulation of synaptic strength by polyubiquitination of PSD95p. The polyubiquitination at the N-terminal end of PSD95p and subsequent proteolysis by the proteasome induces the delocalization and endocytosis of the AMPA receptors. This mechanism will decrease intracellular Ca^{2+} concentrations, modulating the synaptic connection between neurons that follow different activity profiles.

11. Hublin, J. J. The modern human colonization of western Eurasia: When and where? *Quaternary Science Reviews* 118, 194–210 (2015).
12. Quach, H. et al. Genetic Adaptation and Neandertal Admixture Shaped the Immune System of Human Populations. *Cell* 167, 643–656.e17 (2016).
13. Smith, F. H., Janković, I. & Karvanić, I. The assimilation model, modern human origins in Europe, and the extinction of Neandertals. *Quat. Int.* 137, 7–19 (2005).
14. Falk, D. et al. Early hominid brain evolution: A new look at old endocasts. *J. Hum. Evol.* 38, 695–717 (2000).
15. Gunz, P., Neubauer, S., Maureille, B. & Hublin, J. J. Brain development after birth differs between Neandertals and modern humans. *Current Biology* 20, (2010).
16. Leigh, S. R. Brain growth, life history, and cognition in primate and human evolution. *Am. J. Primatol.* 62, 139–164 (2004).
17. Barton, R. A. & Venditti, C. Rapid evolution of the cerebellum in humans and other great apes. *Curr. Biol.* 24, 2440–2444 (2014).
18. Marchetto, M. C. et al. Species-specific maturation profiles of human, chimpanzee and bonobo neural cells. *Elife* 8, (2019).
19. Carlson, K. J. et al. The endocast of MH1, *Australopithecus sediba*. *Science* (80-.). 333, 1402–1407 (2011).
20. Banks, W. E. et al. Neanderthal extinction by competitive exclusion. *PLoS One* 3, (2008).
21. Hublin, J. J. The origin of Neandertals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 16022–16027 (2009).
22. Wißing, C. et al. Stable isotopes reveal patterns of diet and mobility in the last Neandertals and first modern humans in Europe. *Sci. Rep.* 9, (2019).
23. Ponce de León, M. S., Bienvu, T., Akazawa, T. & Zollikofer, C. P. E. Brain development is similar in Neandertals and modern humans. *Current Biology* 26, R665–R666 (2016).
24. Gunz, P. et al. Neandertal Introgression Sheds Light on Modern Human Endocranial Globularity. *Curr. Biol.* 29, 120–127.e5 (2019).
25. Stuchlik, A. Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: An update. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8, (2014).
26. Rogerson, T. et al. Synaptic tagging during memory allocation. *Nature Reviews Neuroscience* 15, 157–169 (2014).
27. Hsieh, J. Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. *Genes and Development* 26, 1010–1021 (2012).
28. Boeckers, T. M. The postsynaptic density. *Cell and Tissue Research* 326, 409–422 (2006).

29. Gray, N. W., Weimer, R. M., Bureau, I. & Svoboda, K. Rapid redistribution of synaptic PSD-95 in the neocortex in vivo. *PLoS Biol.* 4, 2065–2075 (2006).
30. Kornau, H. C., Seeburg, P. H. & Kennedy, M. B. Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 368–373 (1997).
31. Stathakis, D. G., Hoover, K. B., You, Z. & Bryant, P. J. Human postsynaptic density-95 (PSD95): Location of the gene (DLG4) and possible function in nonneural as well as in neural tissues. *Genomics* 44, 71–82 (1997).
32. Carlisle, H. J., Fink, A. E., Grant, S. G. N. & O'dell, T. J. Opposing effects of PSD-93 and PSD-95 on long-term potentiation and spike timing-dependent plasticity. *J. Physiol.* 586, 5885–5900 (2008).
33. Fernández, E. et al. Arc Requires PSD95 for Assembly into Postsynaptic Complexes Involved with Neural Dysfunction and Intelligence. *Cell Rep.* 21, 679–691 (2017).
34. Winkler, D. et al. Hypersocial behavior and biological redundancy in mice with reduced expression of PSD95 or PSD93. *Behav. Brain Res.* 352, 35–45 (2018).
35. Sheng, M. & Sala, C. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annual Review of Neuroscience* 24, 1–29 (2001).
36. Zhu, Y. C. et al. Palmitoylation-dependent CDKL5-PSD-95 interaction regulates synaptic targeting of CDKL5 and dendritic spine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9118–9123 (2013).
37. Frank, R. A. & Grant, S. G. Supramolecular organization of NMDA receptors and the postsynaptic density. *Current Opinion in Neurobiology* 45, 139–147 (2017).
38. Mir, S., Sen, T. & Sen, N. Cytokine-Induced GAPDH Sulfhydration Affects PSD95 Degradation and Memory. *Mol. Cell* 56, 786–795 (2014).
39. Toro, C. & Deakin, J. F. W. NMDA receptor subunit NRI and postsynaptic protein PSD-95 in hippocampus and orbitofrontal cortex in schizophrenia and mood disorder. *Schizophr. Res.* 80, 323–330 (2005).
40. Xing, J. et al. Resequencing and association analysis of Six PSD-95-related genes as possible susceptibility genes for schizophrenia and autism spectrum disorders. *Sci. Rep.* 6, (2016).
41. Ensembl Database. Available at: <https://www.ensembl.org/index.html>.
42. GenBank Database. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
43. Neanderthal Genome database.
44. MEGA X software. Available at: <https://www.megasoftware.net/>.
45. Phyre 2 online software. Available at: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>.
46. SWISS-MODEL online software. Available at: <https://swissmodel.expasy.org/interactive>.
47. PyMOL software. Available at: <https://pymol.org/2/>.
48. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549 (2018).
49. Tamura, K. & Nei, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526 (1993).
50. Le, S. Q. & Gascuel, O. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1307–1320 (2008).
51. Felsenstein, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* (N. Y.) 39, 783 (1985).
52. Colledge, M. et al. Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression. *Neuron* 40, 595–607 (2003).
53. Xu, W. et al. Molecular Dissociation of the Role of PSD-95 in Regulating Synaptic Strength and LTD. *Neuron* 57, 248–262 (2008).
54. Topinka, J. R. & Brecht, D. S. N-terminal palmitoylation of PSD-95 regulates association with cell membranes and interaction with K⁺ channel K(v)1.4. *Neuron* 20, 125–134 (1998).
55. Fukata, M., Fukata, Y., Adesnik, H., Nicoll, R. A. & Brecht, D. S. Identification of PSD-95 palmitoylating enzymes. *Neuron* 44, 987–996 (2004).
56. Byrne, J. H., Heidelberger, R., Waxham, M. N. & Roberts, J. L. From Molecules to Networks. *From Molecules to Networks* (2003). doi:10.1016/B978-0-12-148660-0.X5000-8
57. Globa, A. K. & Bamji, S. X. Protein palmitoylation in the development and plasticity of neuronal connections. *Current Opinion in Neurobiology* 45, 210–220 (2017).
58. Purkey, A. M. et al. AKAP150 Palmitoylation Regulates Synaptic Incorporation of Ca²⁺-Permeable AMPA Receptors to Control LTP. *Cell Rep.* 25, 974–987.e4 (2018).
59. Flores-Soto, M. E. et al. Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología* 27, 301–310 (2012).
60. Zhang, Y. et al. Capping of the N-terminus of PSD-95 by calmodulin triggers its postsynaptic release. *EMBO J.* 33, 1341–1353 (2014).
61. Jaffrey, S. R., Snowman, A. M., Eliasson, M. J. L., Cohen, N. A. & Snyder, S. H. CAPON: A protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. *Neuron* 20, 115–124 (1998).
62. Smith, A. E. et al. Source memory in rats is impaired by an NMDA receptor antagonist but not by PSD95-nNOS protein-protein interaction inhibitors. *Behav. Brain Res.* 305, 23–29 (2016).

Received: 17 november 2020

Accepted: 15 january 2021

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Protein recovery from residual bovine whey: Influence of acid thermo-coagulation

Victoria E. García Casas^{1*}, Jeffrey Vargas Pérez², Roberto Sánchez Companioni³, Nardy Diez García²

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.24

Abstract: Thermal treatment of acidified bovine whey is one of the most efficient traditional methods for the recovery and use of residual proteins in this byproduct and an alternative way of sustainable use of this type of resource. The yield of protein recovery from residual whey obtained as a byproduct was evaluated using the acid thermo-coagulation method. Bovine whey samples were collected in dry and rainy seasons and were subjected to acid thermo-coagulation, and the protein sample preparation was achieved using the TCA/Acetone and TCA/Acetone/Phenol methods. The determination of peptides was accomplished by electrophoresis SDS-PAGE. The TCA/Acetone/Phenol method reported better performance with a higher yield (22.2 µg/ml) than the classic TCA/Acetone method (8.8 µg/ml). The proteins found in higher proportion in whey samples of the dry season, representing 82.6 % of the total protein content, while in whey samples of rainy season equivalent up to 65.4 % of total proteins. The acid thermo-coagulation technique showed high-efficiency performance in whey peptide recovery.

Key words: Electrophoresis, protein recovery, protein sample preparation, whey.

Introduction

Considering the accelerated demographic expansion in the planet, one of the most significant challenges is the conservation, improvement, and sustainable use of natural resources for food and agriculture, as said by the United Nations Food and Agriculture Organization (FAO). This common interest has promoted the endless search and development of new technologies that allow the optimization in the use of available resources, giving added value to byproducts of primary processes, reducing production costs, and mitigating the environmental impact¹.

Whey is the liquid byproduct generated in cheese production; its recovery and use has been studied and is widely known^{2,3}; nevertheless, in developing countries as Ecuador, the use of whey is still limited, restricted to animal feeding, and the unused residue is discharged to the environment without previous treatment⁴, as a contaminant of soils and waters. This work was carried out to determine the recovery yield of bovine whey proteins using acid thermo-coagulation. The acid thermo-coagulation was studied at three different temperatures; two protein sample methods were compared, TCA/Acetone and TCA/Acetone/Phenol, and the peptide profiles were evaluated from whey collected in dry and rainy seasons.

Lacto-serum has excellent importance from the nutritional point of view⁵, because it is rich in high biological value proteins⁴ and is a high nutritive value food^{6,7}, with a high content of essential amino acids^{8,9}.

Bovine whey proteins contain a higher quantity of branched-chain amino acids (BCAA) and essential amino acids than other sources^{10,11}. Whey is additionally an important source of bioactive peptides¹² that are formed by the enzymatic process to which is subjected milk in cheese elaboration^{6,8,13}; whey contents casein macro peptides produced by renin action that causes hydrolysis of κ -casein^{14,15}; besides, it contains minor quantities of lactoferrins, lactoperoxidases, and immunoglobulins among other proteins of interest for the pharmaceutical and food industries¹⁶. However, if these proteins' precipitation is desired, it is necessary to subject whey to temperatures higher than 70°C^{17,18}.

Thermal treatment of acidified whey is the most ancient

traditional procedure used to prepare cottage cheese to recover the proteins that the liquid byproduct contains. This procedure is also used to elaborate food products as spread creams and nutritional supplements in powder, developed from whey proteins¹⁹, as an economical and efficient method⁶. The acid thermo-coagulation involves the change of protein structure, which generates interactions of polypeptide chains²⁰; proteins lose their native structure because of noncovalent interactions, maintaining the structural stability.

The solubility of whey proteins depends on pH, ionic force, and temperature. When pH is low, solubility decreases. β -lactoglobulin is approximately 90 % soluble in its isoelectric point (pI)²¹, while α -lactoalbumin is only 68 % soluble. Temperature is the most critical variable affecting whey protein solubility²²; as temperature increases, protein molecules are denatured and change their tridimensional configuration; ionic and hydrogen bonds are broken, hydrophobic groups are exposed the attractive interactions with water are reduced when the process of denaturation of proteins is irreversible, the aggregation and precipitation occur²³.

Materials and methods

Sample collection and physicochemical analysis

Whey samples were collected in the milk collection center and cheese industry Diprolac, located in canton Balzar, Guayas Province, Ecuador, as a byproduct from enzymatic coagulation of milk Brahman cattle. Samples were collected in dry and rainy seasons. Physicochemical analyses were done to determine protein content, carbohydrates, fat, ashes, total reliable content, acidity, and pH, according to the Ecuadorian Technical Standard NTE INEN 2594:2011 defined by the Ecuadorian Standardization Institute²⁴.

Acid Thermo-coagulation

The protein concentrate was obtained by acid thermo-coa-

¹ Facultad de Ingeniería Química, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.

² Centro de Investigación Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Guayaquil, Ecuador.

³ Instituto Superior Universitario de Formación, Guayaquil, Ecuador.

gulation of sweet whey. Samples of 250 ml were pasteurized at 65°C for 30 minutes; pH was adjusted to 6.51 and 4.6 using 50 % citric acid (C6H8O7) solution. Three different heating treatments were made, adjusting temperature gradually to 65, 75, and 80 °C, with constant stirring and heating periods of 20 minutes. When the final temperature was reached (80 °C), the whey was allowed to stay for 15 minutes and was filtered by gravity with a glass microfiber sheet Whatman grade GF/A, pore size 1.6 µm. During experimentation, whey and retentate samples were taken to evaluate the recovery efficiency and peptide profile at each temperature.

Protein extraction and quantification

Protein extraction was done from six whey samples subjected to three different thermal treatments (65, 75, and 80 °C) by triplicate. The TCA/Acetone and TCA/Acetone/Phenol methods were used following Wang²⁵ modified protocol. Yield recovery and protein concentration were determined by Bradford²⁶ method.

Peptide determination (SDS-PAGE Gel)

SDS-PAGE separated proteins according to the method of Laemmli²⁷. For this, 20 µg of proteins were dissociated in the presence of denaturing buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.6 containing 1% SDS, 8.3 % glycerol, and 0.5 % 2-mercaptoethanol) and incubated at 90 °C for 5 min and separated by electrophoresis on 12 % polyacrylamide gels.

Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue and destained in 7 % acetic acid. Finally, the gels obtained from electrophoresis were analyzed with Imagine Lab Software and the bands' number and intensity, and their molecular weights were determined.

Data Analysis

To observe differences between protein content in lacto-sera collected in dry and rainy seasons, t Student tests were used for two samples, previous Snedecor F test (Fisher-Snedecor distribution) for the determination of data homoscedasticity. Additionally, two factors ANOVA was done to observe differences in the peptide recovery with respect to the treatment stage (whey, 65 °C, 75 °C, 80 °C and retentate) climatic season. The significance limit was stipulated to 2 % ($P < 0.02$) for a confidence level of 98 % in all the analyses. The analysis was made entirely with the Microsoft Excel version 2010 program.

Results

Physicochemical analysis of whey

The physicochemical analysis allowed to establish that

protein content of whey collected in the dry season highly exceeds the protein content of rainy season whey, representing more than twice its value, while the total fat content is higher in the rainy season, as are ashes and carbohydrate content (Table 1).

Contaminant removal by TCA/Acetone and TCA/Acetone/Phenol protocols

The contaminant removal with TCA/Acetone protocol showed a minimum variation in the protein recovery yield for all thermal treatments, while TCA/Acetone/Phenol protocol resulted in higher protein recovery yield with temperature increase. Concerning the final paste obtained with acid thermo-coagulation, it was reported a higher yield using TCA/Acetone/Phenol protocol (22.6 µg/ml) compared to TCA/Acetone (8.8 µg/ml) (Figure 1).

SDS-PAGE TCA/Acetone - TCA/Acetone/Phenol

When comparing SDS-PAGE results for the two protocols used in the protein sample preparation, more defined bands are appreciated for the low molecular weight peptides in the extract obtained by TCA/Acetone/Phenol (Figure 2).

Whey samples collected in dry and rainy seasons did not show relevant differences in the analysis of SDS-PAGE gels, except for lower molecular weight proteins (< 20 kDa), whose bands appear less abundant in dry season whey (Figure 3 left / lanes 2-6) compared to the same type of proteins in rainy season whey (Figure 3 right/lanes 7-11).

Protein quantification in Lacto-sera collected in dry and rainy seasons

Table 2 shows the peptide percent in samples of both climatic seasons; particularly for the dry season, it can be noticed that the paste contains peptides with non-normalized molecular weights of 12.06, 15.43, 17.01, and 27.98 kDa, which represent 82.6 % of the total peptide content in the original whey. On the other hand, the paste obtained from the rainy season showed peptide groups with non-normalized molecular weights of 11.86, 16.51, 17.57 and 26.54 kDa represent the 65.36 % of total peptide content in whey.

Concerning peptides observed in SDS-PAGE in dry and rainy seasons, it can be appreciated that those with molecular weights of 15.43 kDa and 17.01 kDa are found in higher concentration in dry season whey, compared to the peptides of similar molecular weights in rainy season whey. Samples of whey collected in the rainy season showed higher concentrations for the rest of the peptides, and there were no statistically significant differences between each peptide concentration in climatic seasons ($P > 0.05$), except for molecular weight peptides of 15.43 kDa and 16.51 kDa ($t = 3.08$; $P = 0.015$), being these in average, higher in the dry season (21.2 %) than in rainy

Essay	Unit	Rainy season	Dry season	Standard Deviation	Method Reference
Acidity	%	0.09	0.11	0.01	NTE INEN 13
Carbohydrates by difference	%	5.05	4.68	0.26	Calculation
Ashes	m/m	0.52	0.04	0.34	NTE INEN 14:1983
Total fat	%	1.2	0.6	0.42	AOAC 19TH 989.05
pH	—	6.15	6.51	0.25	AOAC 19TH 973.41
Protein	%	1.05	2.9	1.31	AOAC 19TH 991.20 (API 5.8-04-01-00B24)
Total solids	%	7.85	7.68	0.12	NTE INEN 14:1983

Table 1. Physicochemical Analysis of residual whey from Diprolac dairy industry, canton Balzar, Ecuador.

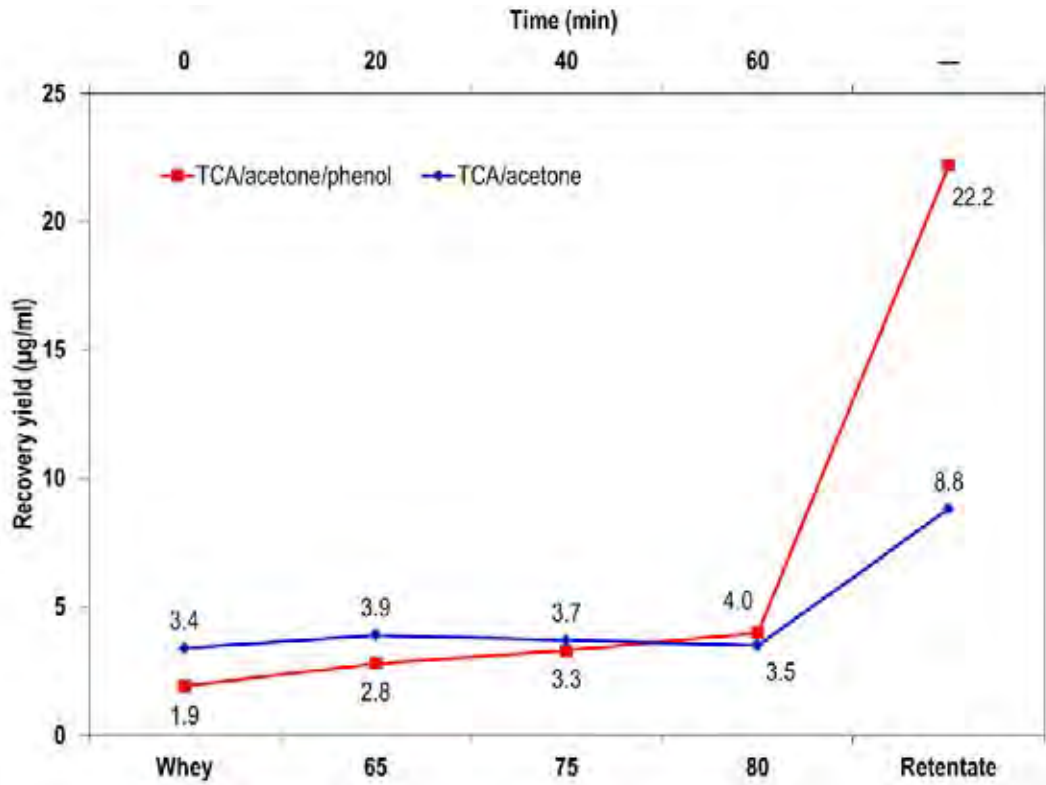


Figure 1. Yield of protein extraction protocols used in bovine whey.

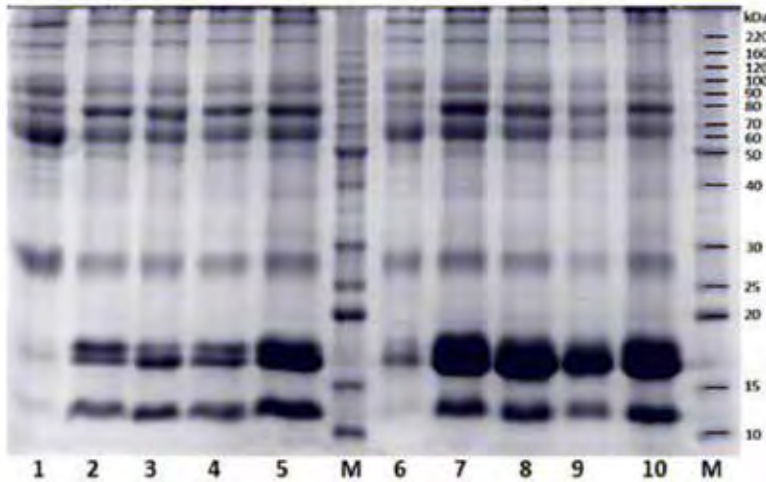


Figure 2. SDS-PAGE gels for each protein extraction protocol. Lanes 1-5, TCA/acetone/phenol; lane 1: whey; lane 2: 65 °C treatment; lane 3: 75 °C treatment; lane 4: 80 °C treatment; lane 5: Paste; lanes 6-10 TCA/acetone; lane 6: whey; lane 7: 65 °C treatment; lane 8: 75 °C treatment; lane 9: 80 °C treatment; lane 10: Retentate; M: protein mass markers.

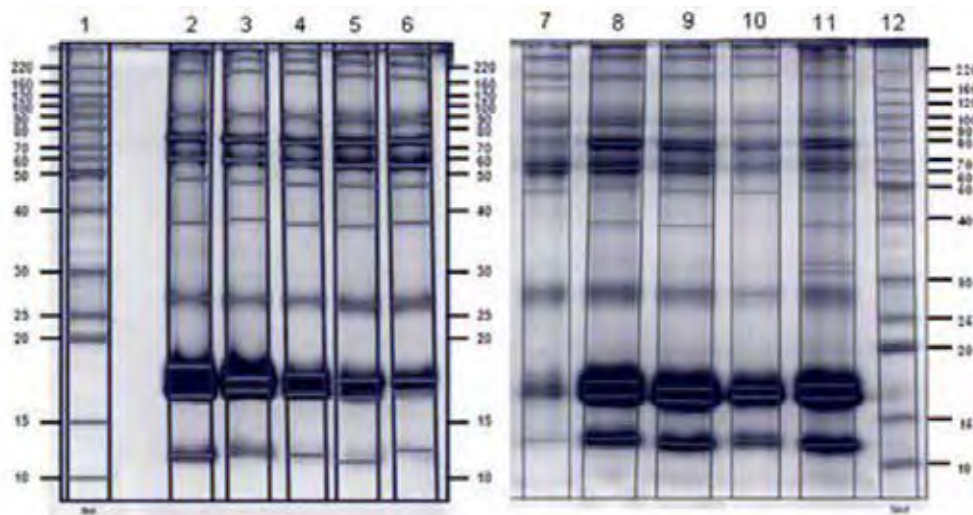


Figure 3. SDS-PAGE gel of dry season (left) and rainy season (right) wheys, using TCA/Acetone/Phenol protocol. 1: Molecular weight marker; 2: Paste; 3: 80 °C treatment; 4: 75 °C treatment; 5: 65 °C treatment; 6: Whey without treatment; 7: Whey without treatment; 8: 65 °C treatment; 9: 75 °C treatment; 10: 80 °C treatment; 11: Paste; 12: Molecular weight marker.

season (5.8 %). Likewise, peptides with molecular weights of 32.44 kDa, 31.01 kDa, and 160.61 kDa in dry season whey were evident, and these particular peptides were not detected in the rainy season whey (Table 2).

On the other hand, according to the ANOVA test, there are no significant differences in the recovery of proteins between the process stages ($F = 0.01$; $P = 0.99$), nor between climatic seasons ($F = 0.04$; $P = 0.99$). Nevertheless, acid thermo-coagulation allows the recovery of soluble proteins from whey with an increase in recovery efficiency, with the increase in temperature.

Conclusions

Characterization of residual whey from cheese industry Diprolac, canton Balzar, Ecuador, in dry and rainy seasons, shows punctual differences; for example, total carbohydrates and fat contents were higher in rainy season whey, while observed protein content was higher in the dry season. These type of differences are common because of changes in livestock feeding associated with climatic seasons^{28,29}; other factors as bovine breed³⁰ and cheese production technology³¹ can also affect characteristics and composition of whey.

The acid thermo-coagulation process studied in this work allowed us to establish that it is not necessary to reach tempe-

ratures higher than 80 °C to achieve a higher protein recovery yield. That was more evident when evaluating results after the extraction with TCA/Acetone/Phenol protocol. As opposed to the results reported by Revilla³² and Vázquez Puente *et al.*¹⁹, which indicate that the rise in denaturation temperature (DT) reports higher recovery yield of protein aggregate, the results obtained in this work showed that at 75°C, stabilization and higher performance of the process is reached.

On the other hand, the acid thermo-coagulation method offers a higher retentate recovery, which is observed in band concentration in SDS-PAGE gels (Figure 2), where a higher peptide concentration in the bands of pastes is appreciated, compared to the bands of whey without treatment.

Paste recovery using TCA/Acetone/Phenol as extraction protocol was higher than treatment without Phenol. During TCA/Acetone/Phenol treatment, washes remove acetone soluble compounds (salts and other polar contaminants) and phenol soluble contaminants (lipids, carbohydrates, and phenolic compounds), obtaining, as a result, a cleaner, less contaminated product, which favors the acid precipitation of proteins²⁵. However, the SDS-PAGE observed results suggest that the contaminant removal protocol does not affect the band pattern.

The paste obtained from dry season whey showed peptides between 12 and 28 kDa, representing 82.6 % of total

Climatic Season	Molecular weight (kDa)	Whey (%)	65° (%)	75° (%)	80° (%)	Paste (%)	\bar{x} (%)
Dry	12.06	0.00	16.21	18.21	16.81	20.36	14.32
	15.43*	3.64	23.11	23.69	29.19	26.27	21.18
	17.01	33.59	28.22	30.67	31.16	28.52	30.43
	27.98	19.02	9.51	7.29	5.47	7.44	9.75
	31.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.01
	32.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.02
	38.86	0.00	0.22	0.40	0.00	0.02	0.13
	48.65	0.58	0.43	0.43	0.23	0.20	0.38
	62.80	20.83	6.13	4.76	4.13	4.53	8.08
	78.21	2.31	6.54	5.66	5.05	5.20	4.95
	95.17	11.17	4.47	4.05	3.50	2.99	5.24
	160.61	0.69	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14
	200.00	4.36	1.45	1.29	1.17	0.00	1.65
	202.37	3.80	1.31	1.64	1.12	0.62	1.70
Total (%)	100	97.61	98.08	97.83	96.27	97.96	
Rainy	11.86	6.83	0.40	0.65	1.51	26.49	7.18
	16.51*	0.00	4.61	3.91	8.03	12.52	5.81
	17.57	15.72	37.83	16.28	15.13	11.79	19.35
	26.54	0.00	14.73	20.62	16.64	14.56	13.31
	37.70	0.00	0.10	0.14	0.25	0.36	0.17
	47.12	0.00	0.55	0.58	0.42	0.73	0.46
	57.18	38.01	15.28	17.37	16.22	8.44	19.06
	73.67	35.49	10.12	16.06	14.13	10.19	17.20
	89.74	0.81	7.21	10.27	9.11	4.73	6.43
	191.07	1.08	1.40	2.10	3.43	0.87	1.78
	220.00	2.07	2.30	3.33	5.18	1.02	2.78
	Total (%)	100	94.54	91.32	90.05	91.70	93.52

* indicates significant differences ($P < 0.02$) in the number of peptides between dry and rainy seasons.

Table 2. Percent of peptide recovery from residual whey in climatic seasons. Results in bold letters stand out the most representative values.

protein content, while proteins of similar weights from the rainy season only represented 65.36 %. Unique proteins were observed in lacto-sera collected in different climatic seasons, for example, 220 kDa in the rainy season. This fact can also be explained by the environmental factors that characterize the climatic seasons, influencing relevant aspects in livestock feeding²⁸.

Even when the preparation process and the thermal treatment used could affect the recovery of specific proteins from whey, as lactoferrin³³, the acid thermo-coagulation shows a good protein recovery yield from whey, that should be considered for the milk food production in general, or yet with possibilities of another application beyond food, for example, health. Thermal treatments are considered more efficient than other procedures, mainly compared to chemical treatments, as the first ones maintain the organoleptic characteristics in the product³⁴.

In conclusion, the results obtained in this work show that acid thermo-coagulation represents a simple, low-cost method that allows the recovery of proteins up to 82 % of the original content in whey. It is remarked that the climatic season in which the whey is collected in Ecuador is not a relevant factor that significantly affects its composition, even when there were minor differences in some punctual aspects.

Acknowledgment

The authors acknowledge the University of Guayaquil's support through the Project FCI No 046-2018. Thank milk collection center "Diprolac," especially to technical responsible, Miguel Silva, to provide us with the lacto-sera samples used in this research.

Bibliographic references

1. FAO. Recursos naturales [Internet]. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; [cited 2019 Sep 8]. Available from: <http://www.fao.org/3/am859s/am859s12.pdf>
2. Pais Chanfrau, Núñez Perez MV, Lara Fiallos Marco V, Rivera Intriago LM, Trujillo Toledo Luis E, Cuaran Guerrero. Valorización del suero de leche: Una visión desde la biotecnología. *Bionatura*. 2017;2(4):468-76.
3. Skryplonek K. The use of acid whey for the production of yogurt-type fermented beverages. *Mljekarstvo Časopis Za Unaprjeđenje Proizv Prerade Mlijeka*. 2018 Mar 29;68(2):139-49.
4. Poveda E. Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Rev Chil Nutr*. 2013 Dec;40(4):397-403.
5. Barac M. White cheeses as a potential source of bioactive peptides. *Mljekarstvo*. 2017 16 February;3-16.
6. Brandelli A, Daroit DJ, Corrêa APF. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Res Int*. 2015;73:149-61.
7. Layman DK, Lönnerdal B, Fernstrom JD. Applications for β -lactalbumin in human nutrition. *Nutr Rev*. 2018 1 June;76(6):444-60.
8. Hernández-Rojas M, Vélez-Ruiz JF. Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *Temas Sel Ing Aliment*. 2014;8(2):13-22.
9. Parra Huertas RA. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Rev Fac Nac Agron*. 2009;62(1):4967-82.
10. Akpinar-Bayazit A, Ozcan T, Yilmaz-Ersan L. Milk-based traditional Turkish desserts. *Mljekarstvo*. 2009;59(4):349-55.
11. Granados-Conde C, González Cuello RE, Galindo S W, Pérez Z D, Pájaro-Castro N. Obtaining cream cheese supplemented with whey solids and inoculated with *Lactobacillus casei*. *ORINOQUIA*. 2016 Dec;20(2):40-6.
12. Hernández-Ledesma B, Ramos M, Gómez-Ruiz JÁ. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Rumin Res*. 2011 Nov 1;101(1):196-204.
13. Gea Kiewiet MB, van Esch BCAM, Garssen J, Faas MM, de Vos P. Partially hydrolyzed whey proteins prevent clinical symptoms in a cow's milk allergy mouse model and enhance regulatory T and B cell frequencies. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(11):1700340.
14. Mielles Cedeño M, Yépez Tamayo LD, Ramírez-Cárdenas L. Elaboración de una bebida utilizando subproductos de la industria láctea. *Enfoque UTE*. 2018 Jun;9(2):59-69.
15. Riquelme Gimesy LF. Repositorio institucional UN [Internet] [Especialización]. [Bogotá, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia; 2010 [cited 2019 Nov 9]. Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/2789/>
16. Pagán J, Benítez R, Ibarz A. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* [Internet]. 2008 Jun 1 [cited 2019 Nov 9]; Available from: <https://www.scienceopen.com/document?vid=c426dd08-4344-4731-8280-988944336043>
17. Lam RSH, Nickerson MT. The effect of pH and temperature pre-treatments on the physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate. *LWT - Food Sci Technol*. 2015 1 January;60(1):427-34.
18. Yadav JSS, Yan S, More TT, Tyagi RD, Surampalli RY. Recovery of residual soluble protein by two-step precipitation process with concomitant COD reduction from the yeast-cultivated cheese whey. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2014 1 September;37(9):1825-37.
19. Vázquez Puente F, Villegas Arroyo G, Mosqueda Frías P. Precipitación de proteínas lactoséricas en función de la acidez, temperatura y tiempo, de suero producido en Comonfort, Guanajuato, México. *Rev Venez Cienc Tecnol Aliment*. 2010;1(2):157-69.
20. Martínez MJ. Impacto de la interacción entre β -lactoglobulina, caseinoglicomacropéptido y polisacáridos en coloides alimentarios [Internet] [Doctoral]. [Buenos Aires, Argentina]: Universidad de Buenos Aires; 2010 [cited 2019 Nov 9]. Available from: https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n4570_Martinez.pdf
21. Cheison SC, Kulozik U. Impact of the environmental conditions and substrate pre-treatment on whey protein hydrolysis: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017 22 January;57(2):418-53.
22. Arce-Méndez JR, Thompson-Vicente E, Calderón-Villaplana S. Incorporación de la proteína del suero lácteo en un queso fresco. *Agron Mesoam*. 2016;27(1):61-71.
23. SanMartín B. Aprovechamiento de suero de quesería de origen caprino mediante la obtención de concentrados de proteínas séricas y subproductos de clarificación. Estudio de sus propiedades tecnológicas. [Internet]. [Lugo]: Santiago de Compostela; 2010 [cited 2018 Sep 15]. Available from: https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/5097/REP_209_12.pdf?sequence=1&isAllowed=y
24. INEN. NTE INEN 2594: Suero de leche líquido. Requisitos [Internet]. Instituto Ecuatoriano de Normalización; 2011. Available from: <http://archive.org/details/ec.nte.2594.2011>
25. Wang W, Vignani R, Scali M, Cresti M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*. 2006 Jul;27(13):2782-6.
26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-54.
27. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
28. Kuczyńska B, Puppel K, Gołbiewski M, Metera E, Sakowski T, Stoniewski K. Differences in whey protein content between cow's milk collected in late pasture and early indoor feeding season from conventional and organic farms in Poland. *J Sci Food Agric*. 2012 Nov;92(14):2899-904.
29. Velázquez Vázquez C, Villa Rojas MG, Alvarez Ramírez C, Chávez-Servín JL, García-Gasca T, Ferriz Martínez RA, et al. Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin-Ciocalteu method. *Food Chem*. 2015 Jun;176:480-6.

30. Briñez WJ, Valbuena E, Castro G, Tovar A, Ruiz-Ramírez J. Algunos parámetros de composición y calidad en leche cruda de vacas doble propósito en el municipio Machiques de Perijá. Estado Zulia, Venezuela. *Rev Científica*. 2008;18(5):607–17.
31. Monsalve J, González D. Elaboración de un queso tipo ricotta a partir de suero lácteo y leche fluida. *Rev Científica*. 2005;15(6):543–50.
32. Revilla A. *Tecnología de la leche*. Honduras: Editorial Reverté; 1996.
33. Won HJ, Yi HC, Jung H, Cho H, Lee B, Hwang KT. Whey Preparation Methods and Thermal Treatment of Milk Affect Recovery of Lactoferrin Using Ion-Exchange Chromatography. *J Food Process Preserv*. 2015;39(6):1976–82.
34. Bilyk O, Slyvka N, Gutyj B, Dronyk H, Sukhorska O. Study of the different ways of proteins extraction from sheep and cow whey for "Urda" cheese production. *EUREKA Life Sci*. 2017 31 May;0(3):3–8.

Received: 19 November 2020

Accepted: 22 January 2021

1607



Técnicas Agrícolas | Cultivo de Tejidos | Bioproductos
Fitopatología/Microbiología | Biología Molecular | Biorremediación



CASE REPORTS / REPORTE DE CASO

Fungoide Mycosis. Case report

Irene Rojas Rondón, Lázaro Vigeo Aranguren, Maritza Miqueli Rodríguez, María de Lourdes Guzmán Martínez, Manuel Alejandro Múzquiz Jiménez

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.25

Abstract: To report the case of a 63-years-old female referred to the Oculoplastic Eyelid and Orbit Department of the ICO "Ramón Pando Ferrer" for two lesions in the left upper eyelid, the biggest one, a 20 mm nodule with a central ulcer full of debris and discharge. It was treated with antibiotics without improvement; a biopsy was carried out with a preliminary report of Mycosis Fungoides. A similar lesion appeared on the lower eyelid after surgery and was treated with perilesional HeberFERON injections, disappearing after three weeks. The final histopathology analysis revealed a Non-Hodgkin skin lymphoma with a high malignancy grade. Conclusions: Diagnosing Mycosis fungoides is difficult in early stages or atypical presentations. It's essential to know this disease and its stages to set it apart from entities with similar characteristics, aiming for an early diagnosis, treatment, and proper follow-up.

Key words: Mycosis fungoides. Cutaneous lymphoma. HeberFERON. Eyelid tumors. Interferons.

Introduction

The first description of Mycosis fungoides (MF) is documented in Alibert's Dermatology Atlas (1768-1837); he described in France the case of a 56-year-old man who presented skin desquamation followed by the apparition of several tumors disseminated on the body, which aspect and consistency reminded the mushrooms, therefore the name. The term is quite ambiguous, and it vaguely means "disease that looks like a fungus"^{1,2}.

In 1870, Pierre Antoine Ernest Bazin made a more detailed description of the clinical phases: eczematous, plaque, and tumoral. After that, in the late XIX century, they discovered that the tumors could appear skipping the prior stages, giving this variety the name "micosis fungoidee demblée" or «primitive mycosis fungoides»^{1,2}.

Some authors refer that this disease shows a preference for males (1.6-2:1) and is more common in middle-aged adults (50 years), although it has been documented in adolescents. It has a higher incidence in highly pigmented races¹⁻⁶.

Nevertheless, the most frequent Lymphoma type (44%), the Non-Hodgkin Extranodal Mature T-Cell Lymphoma that affects the skin, is still a rare condition^{3,9}.

The diagnosis for T-Cell Cutaneous Lymphoma (TCCL) is based on the histopathological and clinical evidence; the immunohistochemistry ascertains the immune-phenotype based on the surface markers lymphocytic infiltrates. The markers used show the predominance of B-Cells or T-Cells and the presence of Natural Killer Lymphocytes^{1,2,5,7}.

The tumors can appear over the preexisting plaques, showing vertical growth. When the lesions appear, the Novo suggests malign T-Cell invasion. At this stage, the entity shows a predilection for the face and skin folds. The presence of nodules and tumors is frequent, and they tend to ulcer and get infected^{1,3,9}.

Ancillary tests include full blood count, peripheral blood smear, a skin biopsy (may need more than one), immune-phenotypification, T-Cell receptor gene rearrangement test, flow cytometry, chest X-ray, CT Scan, PET Scan, and bone marrow biopsy to stage the disease^{1-3,9}.

There are different treatment options. The five standard procedures are: photodynamic therapy, radiotherapy, chemotherapy, pharmacologic therapy, and biologic agents, and new treatment options are under investigation^{1,5,8,9}.

Clinical case

A 63-years-old female was referred to the Oculoplastic Department in our hospital, with the chief complaint of two lesions in the left upper eyelid. The lesions appeared 15 days before the consultation and were treated with an oral antibiotic (ciprofloxacin 500mg twice/day for 7 days). The patient suffered viral conjunctivitis two weeks before the tumor's apparition, and it disappeared with hygienic measures.

The patient had two tumors in the left upper eyelid, close to the other, one of them at the nasal area, measured 20mm approximately, nodular with a central ulcer full of debris and discharge; the second tumor was erythematous, about 3-4mm (figure 1). There were not growing regional lymph nodes, and it also appeared to concurrent with an infectious process, so the antibiotic treatment was extended, adding chloramphenicol ointment three times/day for 15 days. The lesions were getting worse at the end of this treatment.

The quick tumoral growth caused ptosis of the left eyelid (figure 2). We planned the excision of the masses and palpebral reconstruction under local anesthesia. The procedure had good functional and esthetic outcomes.

After the excision, before the histopathological analysis, a new lesion appeared on the lower left eyelid with similar characteristics and evolution to the upper eyelid ones; and also existed erythematous lesions at the right forearm (figure 3).

The histopathological analysis was compatible with Mycosis fungoides, but the pathologist wanted a second opinion. We decided to infiltrate HeberFERON on the surrounding area with this possible diagnosis while waiting for confirmation of biopsy because this treatment would be useful for both possible entities. The treatment was 3.5UI twice a week, for five weeks. The tumor reduced its size after the second dose and disappeared after the third week (figure 4). The arm lesions also disappeared.

The final biopsy determined it was a Non-Hodgkin diffuse skin lymphoma, with a high malignancy grade.

Discussion

The first likely diagnosis was an infection of the eyelid skin, supported by the lesion's characteristics (full of debris,



Figure 1. 63-year-old female with two lesions on the left upper eyelid, the biggest one measured 20mm, was nodular with a central ulcer full of debris, the other lesion was near, resembled an erythematous plaque and measuring 3mm.



Figure 2. The tumoral growth caused eyelid ptosis. This image shows the smaller lesion, an erythematous 3mm plaque.

1609



Figure 3. A: Lower left eyelid tumor, was about 1cm, nodular, a central ulcer, and eyelid erythema. B and C: On the right forearm and upper arm existed erythematous plaques.



Figure 4. A: Lower eyelid lesion reduced its size after the second dose. B: The tumor disappeared in the third week after the use of HeberFERON. The patient was referred to a dermatology specialist after the diagnosis was confirmed.

yellow discharge, and erythema), the smaller tumor, the intense itching, and viral conjunctivitis that resolved spontaneously. The possibility of a malign tumor of the eyelid accompanied by sepsis wasn't ruled out, as the sepsis can mask the tumor characteristics, adding difficulties to the diagnostic process. The literature also mentions multiple keratoacanthomata, very infrequent¹⁰, anyways, we decided to treat the infectious process and re-evaluate the tumor to decide the next step.

Because of the rapid growth and eyelid ptosis, we decided to remove the tumor. The histopathological diagnosis was skin infection vs. keratoacanthoma. The excision with oncological margins caused a severe defect on the eyelid and necessary reconstruction with a rotated skin graft. While we waited for the definitive biopsy result, a new tumor appeared on the lower eyelid, with a similar appearance and growth.

The new lesion's apparition made us keep the differential diagnosis of a viral infection, as it didn't respond to the antibiotics. It is known that keratoacanthoma can have a viral etiology and appear in multiple lesions, although this is controversial¹⁰. The presence of multiple malign tumors made us think about syndromic causes, although it's relatively infrequent in aged patients, and they don't resemble basal carcinomas, so we discarded this diagnostic possibility.

The anatomopathological diagnostic impression was an MF, and the pathologist required a second specialist opinion, with more experience in this kind of disease, as it is an uncommon entity. With this differential diagnosis and the possibility of a viral infection, we decided to wait for the biopsy confirmation. Instead of performing surgical excision of the lower eyelid lesion, we started to infiltrate the surrounding tissue with HeberFERON, as it is used in both entities^{1-3,10}. The treatment was 3.5UI twice/week for five weeks. The tumor reduced its size after the second dose and disappeared after the third week.

The final biopsy reported a Non-Hodgkin diffuse skin lymphoma clinically on the tumoral phase, with a high malignancy grade. We decided to refer the patient to another Institute with Dermatological Department.

Every patient with MF diagnosis, likely or confirmed, must be referred as soon as possible to a dermatologist to confirm the diagnosis and start to treat it accordingly to its phase.

The dermatological affections with eyelid lesions form part of a great group of diseases. For its location and way of the apparition, the patients look for an ophthalmologist instead of a dermatologist. Its similitude with other entities as eyelid infections, malign eyelid tumors, keratoacanthoma, basal cell carcinoma, atypical psoriasis, and others can delay diagnosis treatment.

The histopathological typification as an MF is difficult at the early phases, as the typical characteristics may be absent. Sometimes more than one biopsy is needed to confirm the diagnosis and the differential diagnosis with another kind of lymphoma has to be made^{1,3,6,7}.

Biological therapy is a treatment to stimulate the patient's immune system to combat the tumor. It uses substances produced by the body or at the lab to urge a response or restore cancer's physiological reactions. The Interferon is used to treat multiple entities: viral infections, MF, and other tumors. It alters the cell division, slowing down the tumor's growth, giving time to the immune system to eliminate it^{1,3,7,10}; therefore, we decided to inject HeberFERON on the surrounding tissue, getting great results.

The prognosis of MF is variable and depends on the stage in which the diagnosis was made, the subtype, extension, and the presence of extracutaneous affection. Nowadays, several atypical subtypes have been documented, each very different from the classic forms, giving the disease the title of "great simulator," the reason why one must keep it in mind as a diagnostic possibility^{1,3,6,7}.

MF has a difficult diagnosis in early stages or unusual presentations and must be a differential diagnosis for eyelid lesions with atypical characteristics. The correlation of clinic and anatomopathological characteristics is the keystone to making an early diagnosis^{1-3,5,9}.

Conclusions

It is essential to know this entity and its different stages to differentiate it from other diagnosis with similar lesions to avoid delay of the diagnosis and treatment in patients with Mycosis fungoides.

Bibliographic references

1. Calzado Villarreal L. Linfomas cutáneos de células T (Micosis fungoide / síndrome Sezary): estudio de factores predictivos de progresión y de remisión completa a primer tratamiento. [TESIS]. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina; 2016.
2. González Ramírez RA, Ocampo Candiani J, Méndez Olvera N, Gómez Flores M. Micosis fungoide: Biología y terapéutica Dermatología CMQ. 2006;4(4):278-287.
3. Junco Bonet M, Betancourt Betancourt G, Machado García GJ, Larquin Comet JI. Micosis fungoide en estadio tumoral: Presentación de un caso. Rev. Arch Med Camagüey. 2016;20(1):44-49.
4. Gül U, Soylu S, Aslan E, Yazar Z, Demiriz M. Uncommon presentation of mycosis fungoides: Eyelid margin involvement. J Dermatol. 2008;35(9):581-4.
5. Wieser I, Huean A, Bush AE, Dabaja BS, Duvic M. Periorbital Involvement in Early Stage Mycosis Fungoides. Acta Derm Venereol. 2017; 97(8):976-8.
6. Jesufbegovic D, Char DH. Clinical Variability of Ocular Involvement in Mycosis Fungoides. JAMA Ophthalmol. 2015;133(3):341-3.
7. Martínez Piva MM, Zambrano Franco EA, Kowalczyk AM, Enz PA. Variantes atípicas de micosis fungoide: estudio de cohorte retrospectivo de 15 años. Med Cutan Iber Lat Am. 2017;45(3):185-190.
8. Goggins CA, Gocke MT, Jang S, DeSimone JA. Oral Mycosis fungoide with CD30+ large cell transformation successfully treated with brentuximab vedotin. JAAD Case Rep. 2019;5(2):180-3.
9. Hwa Lim E, Ki Lim S, Im M, Joon Seo Y, Hoon Lee Y, Lee Y. Mycosis Fungoides Diagnosis with an Initial Sign Resembling Benign Dermatitis on the Upper Eyelids. Ann Dermatol. 2015; 27(4):469-71.
10. Rojas Rondón I, Agramonte Centelles IC, Río Torres M. Afecciones palpebrales. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2018.

Received: 24 November 2020

Accepted: 15 January 2021

CASE REPORTS / REPORTE DE CASO

Experiencia en fracturas de clavícula mediodiafisaria con placa de reconstrucción en posición anteroinferior en pacientes del Hospital José Carrasco Arteaga, IESS 2017 Cuenca – Ecuador

Experience in midshaft clavicle fractures with anteroinferior plating technique in patients of Jose Carrasco Arteaga Hospital, IESS 2017 Cuenca –Ecuador

Wladimir Augusto Serrano Barbecho¹, Jennifer Paola Pacheco Rodríguez²

DOI. [10.21931/RB/2021.06.01.26](https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.01.26)

Resumen: Las fracturas mediodiafisarias de clavícula corresponden del 75% al 80% de los casos de fracturas claviculares. En el contexto quirúrgico, existen dos técnicas para reparar este tipo de fracturas: la colocación de placa en posición superior y en posición anteroinferior. La primera técnica es la más usada; sin embargo, la segunda brinda una temprana recuperación, minimiza pérdida de sangre y disminuye intervenciones secundarias con reducción económica en salud. Demostrando ser más efectiva. El objetivo del presente trabajo fue evaluar las ventajas de la técnica de colocación de placa en posición anteroinferior para fractura mediodiafisaria de clavícula. Se estudiaron una serie de casos que describe las ventajas de la técnica de colocación de placa en posición anteroinferior por fractura mediodiafisaria de clavícula en el hospital José Carrasco Arteaga, entre enero a diciembre del año 2017. Analizado mediante estadística descriptiva. Se estudiaron 12 pacientes masculinos entre los 18 y 30 años, previo consentimiento informado y cumplieron con criterios de inclusión. Los datos se obtuvieron de resultados de procedimientos quirúrgicos y fueron analizados en Microsoft Excel. Todas las fracturas mediodiafisarias de clavícula se trataron con colocación de una placa de 6 a 8 orificios de 3.5mm de reconstrucción en posición anteroinferior. No se presentaron complicaciones intra ni posoperatorios. Consolidaron al mes y medio con un buen resultado funcional. La técnica de colocación de placa en posición anteroinferior ofrece el retorno temprano de la función del hombro y evita el riesgo de lesión neurovascular. Además, presenta una baja tasa de prominencia del implante.

Palabras clave: Fractura, clavícula, mediodiafisaria, placa, anteroinferior.

Abstract: Midshaft clavicle fractures correspond to 75% to 80% of clavicular fracture cases. There are two techniques to repair this type of fracture in the surgical context: superior plating and anteroinferior plating. The first technique is very used; however, the second one provides an early recovery, minimizes blood loss, and reduces secondary interventions with the economic reduction in health. It is proving to be more effective. To evaluate of advantages of the technique of anteroinferior plating for midshaft fractures of the clavicle. This is a case series study and describes the advantages of anteroinferior plating due to midshaft clavicle fracture at José Carrasco Arteaga hospital between January to December of 2017. This was analyzed with the descriptive statistic. Twelve male patients were studied between the ages of 18 and 30 years old. They had prior informed consent and complied with inclusion criteria. The data was obtained from the results of surgical procedures and was analyzed in Microsoft Excel. All midshaft fractures of the clavicle were treated with a plate of 6 to 8-hole and 3.5 mm. This was collocated in an anteroinferior position. None had Intra and postoperative complications. All consolidated in a month and a half with an excellent functional result. The technique of anteroinferior plating represents an early return of shoulder function and avoids the risk of neurovascular injuries. Moreover, it does not have implant prominence.

Key words: Fracture, clavicle, midshaft, plating, anteroinferior.

Introducción

Las fracturas de clavícula son lesiones comunes y el tratamiento aún es discutido pues suele ser: quirúrgico o no, dependiendo del caso¹. Se prefiere el tratamiento no quirúrgico para las fracturas de clavícula mediodiafisarias no desplazadas. Sin embargo, la opción de tratamiento para las fracturas de clavícula mediodiafisarias desplazadas sigue siendo controvertido^{2,3}.

Se encasillan las fracturas de clavícula entre el 2.6 al 5% de todas las fracturas del cuerpo y del 75 al 80% ocurren en el tercio medio. En niños representa entre el 5% al 15%, en adolescentes el 15% y en el adulto del 2.6% al 10%. Siendo más incidente en varones jóvenes activos, generalmente menores de 25 años y en mujeres adultas entre la quinta y sexta década de vida¹.

Con respecto al tratamiento quirúrgico se debatirá la me-

yor técnica de colocación de placa tanto superior como anteroinferior. La posición de la placa en el contexto superior en la fractura de clavícula mediodiafisaria es la técnica habitual, la más usada en nuestro medio, aceptada mundialmente y que todo cirujano ortopedista la ha realizado; por lo mismo, todo cirujano ortopedista sabe que con la misma existe un mayor riesgo de lesión neurovascular debido a la perforación y manipulación de la fractura^{4,5}. Además de problemas relacionados con la prominencia de la placa, irritación de la piel y la consiguiente extracción del material^{6,7}.

Existe evidencia que fracturas con falta de unión, ventajosamente sanaron en menor tiempo con la técnica de posición anteroinferior, dando una excelente tasa de curación con retorno temprano a la función⁸⁻¹² y minimizando la pérdida de sangre¹³. Asimismo; con el uso de ésta técnica se evitan ciertas

complicaciones para el paciente, se disminuyen intervenciones secundarias y de ésta forma existe reducción económica para el sistema de salud¹⁴.

Materiales y métodos

Se trata de un estudio de serie de casos, que describe: las ventajas de la técnica de colocación de placa en posición anteroinferior por fractura mediodiafisaria de clavícula, los resultados de ésta práctica y evolución postoperatoria de los pacientes. Se lo estudió mediante estadística descriptiva y método observacional, utilizando como técnica el análisis documental de los resultados de procedimientos quirúrgicos asentados en historias clínicas del sistema AS400 del hospital José Carrasco Arteaga, entre enero a diciembre del año 2017. Se examinaron los registros clínicos de 12 pacientes masculinos, en edades comprendidas entre los 18 y 30 años de edad. Cuentan con consentimiento informado previo; además, cumplieron con criterios quirúrgicos actuales o criterios de inclusión (Tabla.1) y el seguimiento médico fue durante 1 año. También, se excluyeron a todos los pacientes con fracturas de clavícula que no fueran mediodiafisarias, que no fueran desplazadas, menores de 18 años y mayores de 30 años. Asimismo, los datos obtenidos fueron tabulados y analizados en Microsoft Excel. De este modo las variables consideradas a estudiar fueron cuantitativas: edad; y cualitativas: sexo y fractura mediodiafisaria de clavícula desplazada.

Resultados

El periodo de estudio fue de un año, en el cual se evaluó a 12 pacientes masculinos entre las edades de 18 a 30 años de edad. Todos presentaron trauma de alta energía como: accidente de tránsito y caída de altura con trauma lateral del hombro. Entonces como consecuencia se fracturaron la clavícula en la diáfisis media, siendo la misma desplazada, por lo que se les trató con la técnica de colocación de placa en posición anteroinferior (Figura 1).

Durante la realización de la técnica se realizó un abordaje longitudinal donde se encontró que el 66% de los traumas se dieron a nivel de hombro dominante y la inestabilidad por tercer fragmento se presentó en dos pacientes; en quienes se realizó una fijación adicional con tornillo, además de usar la

técnica inter fragmentaria. Asimismo, en todas ellas se utilizó una placa de reconstrucción de 3.5 mm con 6-8 orificios, la misma que es pre contornea con una angulación prominente posterior sobre todo a nivel de tercio distal (Figura 2).

La colocación de la placa anteroinferior nos permite dirigir la broca en dirección postero superior; esto concede una visualización directa del medidor de tornillos, tomando una medida exacta de la longitud del tornillo sin necesidad única del tacto o del uso del intensificador de imagen. En la figura 3 podemos observar que con la técnica inter fragmentaria se fija un tercer fragmento con tornillo cortical de 3.5 mm.

En todos los casos se logró estabilizar la fractura, en ninguno se produjo lesión neurovascular; debido a que: la dirección de los tornillos, perforación con broca e incluso la medición con esta técnica hace que sea imposible daño a otras estructuras, algo que se puede presentar con la técnica habitual de colocación de placa superior. En la que, desde la perforación, medición y hasta la colocación del tornillo puede lesionar órganos que se encuentran bajo la clavícula. Todo cirujano ortopedista con experiencia sabe que al perforar se vence la resistencia del hueso cortical; siendo la cortical inferior, la zona de mayor seguridad. Y con esto las fuerzas de carga con el perforador y la broca pueden resultar en perforación pulmonar debido a la técnica de colocación de placa en posición superior. No así con la técnica de colocación anteroinferior se evitan estas posibles complicaciones intra operatorias (Figura 4).

Manejo y control posoperatorio

Ahora bien; algo que sí se consideraría una dificultad con esta técnica, es que al realizar valoraciones o controles postoperatorios no se puede evidenciar de manera clara la evolución de la consolidación que presenta el hueso por la interposición de la placa, como podemos apreciar en la figura 5. En la misma no se observan los tornillos, pero sí se obtiene una visión directa de la fijación de la placa. Entonces la consolidación al ser de tipo directa no forma callo óseo cuantioso.

En efecto, en ninguno de los casos se presentó complicaciones ni intra operatorias ni pos operatorias además se manejó adecuadamente el dolor inmediato. Al mes y medio todas éstas fracturas consolidaron con un buen y temprano resultado funcional. No presentaron desplazamiento de los fragmentos ni aflojamiento. Consecuentemente, pacientes no refirieron molestias tales como: dolor, irritación de la piel por protuberancia del material, alteración de la sensibilidad o

Fracturas específicas:	1.- Desplazamiento >2cm. 2.- Acortamiento > 2cm. 3.- Fractura comminuta > 3 fragmentos. 4.- Fracturas segmentarias. 5.- Fracturas abiertas. 6.- Fracturas abiertas con tejido delicado comprometido. 7.- Deformidad. 8.- Mala posición escapular en el examen inicial.
Lesiones asociadas:	1.- Daño vascular que requiere reparación. 2.- Déficit progresivo neurológico. 3.- Fractura ipsilateral superior. 4.- Múltiples fracturas ipsilaterales superiores o de costilla. 5.- "Hombro flotante". 6.- Fractura clavicular bilateral.
Factores del paciente:	1.- Poli trauma con requerimiento temprano de soporte de peso o uso de miembro superior. 2.- Motivación del paciente para retorno temprano de la función.

Tabla 1. Indicaciones para tratamiento quirúrgico en fractura mediodiafisaria de clavícula¹⁵.



Figura 1. Radiografía de un paciente con fractura medioclavicular de clavícula desplazada.



Figura 2. Fotografía de la placa de reconstrucción de 3.5 mm.



Figura 3. Fotografía de reducción de fractura de clavícula medioclavicular con tornillo inter fragmentario y estabilización con placa de 3.5mm en posición anteroinferior.



Figura 4. Fotografía de la placa colocada en posición anteroinferior.



Figura 5. Radiografías de control pertenecientes a cuatro pacientes con placa colocada en posición anteroinferior.

alteración en la respiración, debido a la excelente estabilidad de la placa por la técnica de colocación anteroinferior. Tras la revisión clínica, los pacientes pudieron elevar su miembro superior sin dolor ni limitación física y tras revisión radiológica se observa consolidación directa sin encontrarse la formación de callo óseo exuberante. Por lo tanto, se evitó reintervenir por complicaciones y a su vez se redujo gastos en salud. Al no presentar molestias permiten ser valorados a largo plazo. Siendo

efectivo su seguimiento clínico radiológico, el cual fue durante un año, sin reportar novedades.

Discusión

El presente artículo a pesar de tener un número bajo de casos, demostró ser una técnica segura y confiable en el grupo

etario más común en el que se presentan estas fracturas, según la literatura internacional. Su punto más sobresaliente es la seguridad en ésta técnica, ya que la visualización del trayecto tanto de broca como de tornillos nos garantiza la reducción al mínimo de complicaciones, sobre todo neurovasculares, que pueden llegar a comprometer la vida o funcionalidad de la extremidad del paciente.

El abordaje longitudinal es similar a la técnica de colocación de placa en posición superior, pero al colocar una placa en posición anteroinferior evitamos la molestia de la prominencia del material como ocurre en la antes mencionada y recuerde, siempre en esta técnica el pre moldeado de la placa es importante, sobre todo a nivel de la curvatura posterior del tercio distal.

Por lo tanto, comparando con el estudio "Anterior inferior plating of middle-third fractures of the clavicle" el cual es muy parecido al presente trabajo investigativo; se estudiaron 26 pacientes con criterios de inclusión similar y se trataron con la técnica de recubrimiento anteroinferior. De igual manera se usó una placa de 3.5 mm, destacando: temprano retorno a la actividad funcional y sin necesidad de extracción del material por complicaciones afines con el implante. Entonces, concluyeron que está práctica es eficaz y positiva, pues impide la lesión de órganos vitales⁵.

Así mismo, en el meta-análisis "Midshaft fractures of the clavicle: A meta-analysis comparing surgical fixation using antero inferior plating versus superior plating" menciona que la técnica de colocación superior se vinculó a cifras altas de extracción del material porque producía dolor e irritación de la piel⁶. En tanto, el estudio "Clinical comparison of two different plating methods in minimally invasive plate osteosynthesis for clavicle midshaft fractures: A randomized controlled trial" afirma que el recubrimiento anteroinferior brinda excelentes resultados, especialmente hablando en la disminución de complicaciones⁷. Del mismo modo, el meta análisis "Anterior inferior plating versus superior plating for clavicle fracture: a meta-analysis" asevera que la técnica de colocación anteroinferior puede reducir la pérdida de sangre, la reintervención y el tiempo de unión¹³.

La experiencia con esta técnica demostró, que NO es necesario usar rayos X durante la intervención, pues la técnica quirúrgica es bajo visión directa. Por lo tanto: el tiempo de exposición al equipo de rayos X, el uso de personal como es el tecnólogo en imagen y el tiempo para el posicionamiento del equipo se elimina. La medición de la longitud de los tornillos es exacta y segura; ya que la visualización directa lo permite, pues la trayectoria de la broca y de los tornillos al ser en dirección anteroinferior hacia posterosuperior evita dañar partes blandas y vitales.

Entonces el procedimiento quirúrgico de Reducción abierta y fijación interna con placa anteroinferior estabiliza la fractura, consiguiéndose una consolidación de tipo directa; por lo tanto, no se encuentra callo óseo exuberante. A su vez, la posición de la placa no permite una visualización directa del hueso en una proyección antero posterior de hombro centrada en la clavícula; por esto se sugiere la proyección de Zanca. Además, la evolución clínica es favorable; pues tras la revisión clínica, los pacientes pueden elevar su miembro superior sin dolor ni limitación física. Y tras el seguimiento radiológico se observó una correcta posición de la placa y de la clavícula; asimismo, no se encontró desplazamiento de los fragmentos ni aflojamiento.

Actualmente otro inconveniente es que, la técnica más usada es la colocación de placa en posición superior y es la que más complicaciones conlleva, según la bibliografía. Por lo tanto, lo que se intenta con este tipo de investigación es que la

técnica de colocación superior deje de ser en la práctica quirúrgica la más manejada; para que así, la técnica de colocación de placa en posición anteroinferior tome más terreno en éste ámbito y se convierta de poco a poco en la práctica más utilizada para reconstrucción de fracturas mediodiafisarias de clavícula por: su temprana recuperación, reducción de complicaciones y disminución de gastos en salud.

Conclusiones

La colocación anteroinferior de la placa para las fracturas de clavícula mediodiafisarias representa: pocas complicaciones y un retorno temprano de la función del hombro. Además, proporciona una fijación estable evitando el riesgo de lesión de estructuras neurovasculares y del pulmón. Asimismo; representa una baja tasa de prominencia del implante, evitando: su extracción precoz, alteración en la sensibilidad e irritación de la piel. También minimiza pérdidas sanguíneas. De igual forma reduce el tiempo de unión durante la consolidación del hueso por la excelente estabilidad que otorga esta técnica. De ésta forma; disminuye intervenciones secundarias por complicaciones, entonces representa reducción económica para el sistema de salud. No hay uso de rayos X durante la cirugía y existe medición exacta de la longitud de los tornillos por visualización directa.

Aspectos bioéticos

La información recolectada es estrictamente confidencial y cuenta con la autorización de los participantes. No se dan a conocer los nombres de los sujetos de estudio ya que los datos recolectados serán únicamente utilizados por los autores para el presente trabajo.

Perspectiva del paciente

Refieren un adecuado control del dolor inmediato y no haber presentado otras molestias posteriores. Además, que la técnica quirúrgica aplicada fue cómoda y con pronta recuperación. Se cuenta con los respectivos consentimientos informados.

Conflictos de Interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Contribución de los autores

Los autores han contribuido en la concepción, diseño del trabajo, búsqueda bibliográfica y análisis crítico.

Financiamiento

Autofinanciado.

Referencias bibliográficas

1. Carvajal, M. Gómez, C. Borja, W. Sepúlveda, L. Fracturas diafisarias de la clavícula: revisión de la evidencia publicada. *Rev. Bios.* 2016 Jun; 15(1):87-97. DOI: 10.17151/biosa.2016.15.1.10
2. Ahn, Leah. Sheth, Ujash. Midshaft Clavicle Fractures - Trauma - Orthobullets [Internet]. Midshaft Clavicle Fractures. 2020 [citado 25 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.orthobullets.com/trauma/1011/clavicle-shaft-fractures>.
3. Zlowodzki, M. Zelle, B. Cole, P. Jeray, K. Mckee, M. Treatment of acute midshaft clavicle fractures: systematic review of 2144 fractures on behalf of the Evidence-Based Orthopaedic Trauma Working Group. *Rev. PubMed.* 2005 Aug; 19(7):504-7. DOI: 10.1097/01.bot.0000172287.44278.ef

4. Collinge, C. Devinney, S. Herscovici, D. DiPasquale, T. Sanders, R. Anterior-inferior plate fixation of middle-third fractures and non-unions of the clavicle. *Rev. PubMed.* 2006 Nov; 20(10):680-6. DOI: 10.1097/01.bot.0000249434.57571.29
5. Chen, C. Juhn, R. Ko, J. Anterior -inferior plating of middle-third fractures of the clavicle. *Rev. PubMed.* 2010 Apr; 130(4):507-511. DOI: 10.1007/s00402-009-0993-7
6. Nourian, A. Dhaliwal, S. Vangala, S. Vezeridis, P. Midshaft fractures of the clavicle: A meta-analysis comparing surgical fixation using anteroinferior plating versus superior plating. *Rev. PubMed.* 2017 Sep; 31(9):461-467. DOI: 10.1097/BOT.0000000000000936
7. Sohn, H. Sohn, M. Lee, K. Song, S. Clinical comparison of two different plating methods in minimally invasive plate osteosynthesis for clavicle midshaft fractures: A randomized controlled trial. *Rev. PubMed.* 2015; 46(11):2230-8. DOI: 10.1016/j.injury.2015.05.038
8. Baltes, T. Donders, J. Kloen, P. What is the hardware removal rate after anteroinferior plating of the clavicle? A retrospective cohort study. *Rev. PubMed.* 2017 May; 26(10):1838-1843. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jse.2017.03.011>
9. Gilde, A. Jones, C. Sietsema, D. Hoffmann, M. Does plate type influence the clinical outcomes and implant removal in midclavicular fractures fixed with 2.7mm anterior inferior plates? A retrospective cohort study. *Rev. PubMed.* 2014 Jul; 4(9):55. DOI: 10.1186/s13018-014-0055-x
10. Kloen, P. Sorkin, A. Rubel, I. Helfet, D. Antero inferior plating of midshaft clavicular nonunions. *Rev. PubMed.* 2002 Jul; 16(6):425-30. DOI: 10.1097/00005131-200207000-00011
11. Donnelly, T. MacFarlane, R. Thomas, M. Ralte, P. Waseem, M. Fractures of the Clavicle: An Overview. *Rev. PubMed.* 2013 Sep;7(1): 329–333. DOI: 10.2174/1874325001307010329
12. Cory, C. Scott, D. Dolfi, H. Thomas, D. Roy, S. Open Reduction and Anterior-Inferior Plating of Middle-Third Fractures and Nonunions of the Clavicle [Internet]. Orthopaedic Trauma Association. [citado 25 de febrero de 2020]. Disponible en: https://ota.org/sites/files/legacy_abstracts/ota99/otapa/OTA99102.htm
13. Ai, J. Kan, S. Li, H. Xu, H. Liu, Y. Ning, G. Feng, S. Anterior inferior plating versus superior plating for clavicle fracture: a meta-analysis. *Rev. PubMed.* 2017 Apr; 18(1): 159. DOI: 10.1186/s12891-017-1517-1
14. Serrano, R. Borade, A. Mir, H. Shah, A. Watson, D. Infante, A. Frankle, M. Mighell, H. Horwitz, D. Anterior - inferior plating results in fewer secondary interventions compared to superior plating for acute displaced midshaft clavicle fractures. *Rev. PubMed.* 2017 Abr; 31(9):468-471. DOI: 10.1097/bot.0000000000000856
15. Tornetta, P. Ricci, W. Court-Brown, C. McQueen, M. McKee, M. Clavicle Fractures. *Rockwood and Green's Fractures in Adults.* 8va ed. United States: Wolters Kluwer Health; 2015, p. 1444.

Received: 20 Diciembre 2020

Accepted: 15 Enero 2021

REVIEW / ARTÍCULO DE REVISIÓN

Presencia de productos farmacéuticos en el agua y su impacto en el ambiente Presence of pharmaceutical products in water and its impact on the environment

Checa Artos Miriam¹, Sosa del Castillo Daynet¹, Ruiz Barzola Omar^{1,2}, Barcos-Arias Milton^{1*} DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.27

Resumen: Los productos farmacéuticos (PFs) constituyen un grupo importante de los contaminantes emergentes (CE), debido a su potencial para inducir efectos fisiológicos adversos a bajas concentraciones en humanos y animales. Muchos estudios alrededor del mundo han reportado la presencia de un sin número de estos compuestos en diferentes medios acuáticos, lo que genera preocupación por los posibles efectos negativos que se producen en el agua, en la salud humana y la vida silvestre. En este contexto, este artículo tiene por objetivo presentar una revisión de los aspectos más relevantes sobre la presencia de PFs en el agua en un ámbito global desde el año 2010 hasta el 2019. El mayor número de estudios reportan presencia de contaminantes emergentes incluyendo fármacos de diferentes tipos en aguas superficiales, aguas subterráneas, aguas residuales y agua potable. Las principales fuentes de ingreso de fármacos en los sistemas acuáticos provienen de las aguas residuales que recogen aguas domésticas, efluentes hospitalarios y efluentes de fábricas sin tratamiento o inadecuadamente tratadas antes de ser liberadas a ríos y mares. La presencia de PFs en el ambiente acuático preocupa por su persistencia, la bioacumulación, la toxicidad y la generación de resistencia a antibióticos de muchos microorganismos, entre otras consecuencias aún no estudiadas en el ambiente.

Palabras clave: Productos farmacéuticos, contaminantes emergentes, riesgos ambientales, medio ambiente acuático.

Abstract: Pharmaceutical products (PPs) are an important group of emerging pollutants (EP), due to their potential to induce adverse physiological effects at low concentrations in humans and animals. Many studies around the world have reported the presence about these compounds in different aquatic ecosystems, raising concerns about the potential negative effects that occur on water, human health, and wildlife. In this context, this article aims to present a review on a global level of the most relevant aspects for the presence of PPs in water, since 2010 to 2019. The increased number of studies report the presence at emerging contaminants including PPs of different types in surface water, groundwater, wastewater and drinking water. The main sources of PPs entry into aquatic systems are due to discharges of wastewater that collect domestic water, hospital effluents and effluents from untreated or inadequately treated factories before being released into rivers and seas. The presence of PPs in the aquatic environment concerns about their persistence, bioaccumulation, toxicity and the generation of antibiotic resistance from many microorganisms, among other consequences not yet studied in the environment.

Key words: Pharmaceuticals, emerging pollutants, environmental risk, aquatic environment.

Introducción

Los productos farmacéuticos (PFs) son contaminantes emergentes que en concentraciones muy bajas inducen efectos fisiológicos en seres humanos y potenciales efectos adversos en la vida silvestre acuática y terrestre. La mayoría de los productos farmacéuticos ingresan a los sistemas acuáticos después de la ingestión y posterior excreción como compuestos principales no metabolizados o como metabolitos, lo que ha llevado a que su presencia sea reportada en sistemas de tratamiento de aguas residuales, aguas subterráneas, agua potable, aguas superficiales fluviales y marinas^{1,2,3,4}. Los PFs se caracterizan por ser usados extensamente en medicina humana y veterinaria y están conformados por diversos grupos de compuestos como antibióticos, analgésicos, antiinflamatorios, antidepresivos, drogas de abuso, antidiabéticos, suplementos alimenticios, entre otros. La gran mayoría de estos fármacos se excretan sin metabolizar después de su aplicación, llegando así a las aguas residuales^{4,5,6}.

Durante las últimas dos décadas, los científicos, las agencias reguladoras y la Comisión Europea han reconocido que los productos farmacéuticos son un problema ambiental emergente y por tanto han sido considerados "contaminantes de preocupación emergente"^{7,8}. Cabe indicar que las aguas re-

siduales tratadas frecuentemente se usan para riego, el lodo residual de la planta de tratamiento se utiliza muchas veces como fertilizante en la agricultura, asimismo, los productos veterinarios son usados indiscriminadamente por lo que la contaminación de suelos y de fuentes de agua ocurre en forma directa. Los PFs también pueden ser liberados a los ambientes acuáticos desde los sitios de fabricación y de asistencia médica como hospitales y clínicas⁹. Como contaminantes emergentes, los PFs presentan diferentes propiedades persistentes, pues la exposición prolongada a estos contaminantes, inclusive a concentraciones muy bajas, constituyen una amenaza significativa para el medio ambiente y la salud humana^{3,5,10,6}. La aparición de contaminantes emergentes como los PFs a nivel de trazas en aguas residuales, aguas destinadas a potabilización y agua potable, requieren de estudios rigurosos⁵, dado que las plantas convencionales de tratamiento no están diseñadas para remover este tipo de contaminantes¹¹. Aún existen vacíos de información y conocimiento sobre el transporte, el destino de los PFs en diferentes medios y los riesgos asociados a ello, de ahí la necesidad de estudiarlos en diferentes matrices, especialmente en agua potable, fuentes de agua superficial y subterránea con miras a desarrollar tecnologías de tratamiento,

¹ Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias de la Vida, FCV, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, CIBE, Guayaquil, Ecuador.

² Departamento de Estadística, Universidad de Salamanca, USal, Salamanca, España.

*Autor para correspondencia; mbarcos@espol.edu.ec

control y generar conciencia sobre esta problemática^{12,13,6}. La literatura reporta la presencia de contaminantes emergentes en el agua y sus múltiples implicaciones, por lo que esta revisión tiene como objetivo proporcionar una visión general de la presencia de PFs en el agua, analizando la importancia de la investigación de los riesgos ambientales asociados a los PFs, las brechas existentes de la investigación y las perspectivas para futuras investigaciones.

Presencia de productos farmacéuticos y fuentes de contaminación en diferentes partes del mundo

Nuestra sociedad técnicamente desarrollada ha sido capaz de diseñar y producir una gran variedad de compuestos químicos, más de 300 mil químicos inventariados y regulados se usan actualmente en la industria, el hogar y la agricultura. Estos productos químicos incluyen aproximadamente 4000 productos farmacéuticos con una producción anual superior a cientos de toneladas, que se administran en todo el mundo como medicamentos recetados, medicamentos terapéuticos de venta libre y medicamentos veterinarios^{14,15}. Los ingresos farmacéuticos mundiales han aumentado de 390.200 millones de dólares EE.UU en 2001 a 1105.200 millones de dólares EE.UU en 2016, lo que indica un aumento del consumo farmacéutico en 2,8 veces en los últimos 15 años¹⁵.

Según (16), un total de 110 PFs fueron identificados en el mar Ártico, gracias a la capacidad analítica moderna. En un estudio realizado en Algeria, se reportó la presencia de ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco en aguas superficiales, ibuprofeno y ketofreno en agua de grifo, confirmando la incapacidad de una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) clásica para eliminar estos contaminantes y la presencia de otras fuentes de contaminación como la industria y la agricultura¹. El estudio realizado por (17) analiza la aparición de PFs detectados frecuentemente como los antibióticos, antiinflamatorios, reguladores de lípidos, carbamazepina y cafeína en aguas subterráneas, señalando que las fuentes de emisión de PFs son las aguas residuales y aguas superficiales contaminadas, vertederos, sistemas sépticos, cría de ganado y fugas de alcantarillado, siendo estas mismas fuentes de contaminación las que afectan a las aguas superficiales¹⁸. En el agua potable provenientes de un acuífero ubicado en Massachusetts, EE. UU., los productos farmacéuticos más frecuentemente detectados fueron la fenitoína anticonvulsivante, carbamazepina y sulfametoxazol, a concentraciones que oscilaban entre 66 y 113 ng/L¹⁹.

Se detectó una amplia gama de antibióticos en la mayoría de las especies de peces estudiadas: bagre amarillo (*Pelteobagrus fulvidraco*), (*Misgurnus anguillicaudatus*), gudgeon de boca superior (*Pseudorasbora parva*); en especies de crustáceos como el cangrejo (*Eriocheir sinensis*), el caracol del río (*Viviparus*), los camarones (*Macrobrachium nipponense*) y la langosta (*Palinuridae*); y en plantas acuáticas como *Hydrocharis dubia*, *Ceratophyllum demersum* y *Salvinia natans* recolectados en el lago Baiyangdian, China. Las concentraciones de antibióticos en los crustáceos fueron de 129, 253 y 1769 µg/kg, respectivamente²⁰. Compuestos farmacéuticamente activos como carbamazepina, eritromicina, propanolol, roxitromicina, ibuprofeno y diclofenaco se detectaron en las muestras de sedimentos y aguas superficiales en el lago Taihu, China, con concentraciones que oscilaban entre 0,78 y 42,5 ng/L de peso seco y 8,74 a 118 ng/L, respectivamente²¹. Por otra parte se informó que el nivel de contaminación y distribución de residuos farmacéuticos en el agua de mar costera y los efluentes de la planta de tratamiento de aguas residuales en el norte de Taiwán fueron considerables, de tal forma que la concentra-

ción notificada de ketoprofeno, ibuprofeno, diclofenaco y ácido clófrico en el afluente fue de 128 a 184 ng/L, 724 a 2200 ng/L, 152 a 185 ng/L, 104-109 ng/L, y en el efluente fue 68 a 128 ng/L, 552 a 1600 ng/L, 100 a 131 ng/L, y 95 a 102 ng/L, respectivamente²².

Se comprobó la presencia de compuestos farmacéuticos en la entrada y salida de aguas residuales en algunas plantas de tratamiento de Inglaterra. Se detectaron cafeína (23.778 y 1744 ng/L); 1,7-dimetilxantina (20.400 y 121 9 ng/L); nicotina (3919 y 85 ng/L); codeína (1255 y 372 ng/L); tramadol (1122 y 738 ng/L)²³. En otro estudio realizado en muestras de un sistema de tratamiento de agua potable cerca del río Medway, Reino Unido, se reportó la presencia de carbamazepina (53 a 265 ng/L), ácido meclofenámico (28 a 176 ng/L), propanolol (8 a 35 ng/L), entre otros²⁴. Así mismo en las muestras de aguas subterráneas y superficiales recogidas de la zona industrial farmacéutica de Sango Ota, en el estado de Ogun en Nigeria, revelaron la presencia de ciprofloxacina, paracetamol, cloroquina y diclofenaco a concentraciones que oscilan entre 1 y 17g/L²⁵. En una campaña en Lagos, Nigeria, en lodos de aguas residuales y aguas superficiales se detectó diclofenaco en concentraciones de hasta 1100 µg/kg de peso seco e ibuprofeno en concentraciones de hasta 8,8 g/L²⁶.

En América latina, un total de 51 contaminantes emergentes se encontraron en estudios relacionados con aguas residuales. Ecuador fue el país con mayor número de muestras (11) en agua residual, seguido de México (7), Brasil y Colombia (3), Argentina y Venezuela (1). La cafeína presentó las concentraciones más altas (5.597.000 ng/L), seguida de la benzoilcogonina (1.065.000 ng/L) y la carbamazepina (830.000 ng/L). Los contaminantes con una mayor frecuencia de mediciones fueron ibuprofeno, carbamazepina, trimetoprima, sulfametoxazol, cafeína y naproxeno. Los países que investigaron estos contaminantes con más énfasis fueron Ecuador y México⁴. En varios estudios llevados a cabo alrededor del mundo, los fármacos acetaminofén, ibuprofeno, diclofenaco, sulfametaxazol y ciprofloxacina han sido detectados en aguas superficiales^{2,27-30}; en aguas subterráneas^{17,20,31-33}; en aguas residuales^{5,34-43}; en agua potable⁴⁴⁻⁴⁶.

Los productos farmacéuticos como contaminantes emergentes se han estudiado en todo el mundo, sin embargo, la gran mayoría de los estudios incluyen estudios de caso en los Estados Unidos de América, Canadá, Europa y Asia. En América Latina y África, hay una falta de información relacionada con contaminantes emergentes en el medio acuático^{4,47}. Los principales productos farmacéuticos que se han reportado en concentraciones diferentes y en distintas matrices se resume en la tabla 1.

El mayor número de estudios analizados para esta revisión bibliográfica reportan fármacos como contaminantes emergentes en Europa con un total de 104 referencias de fármacos detectados en sistemas acuáticos. Del mismo modo, el menor número de reportes señalan a África y Latinoamérica como los continentes con menos estudios realizados acerca de PFs como contaminantes emergentes con un total de 22 y 27 referencias bibliográficas respectivamente. En este contexto, se puede evidenciar la necesidad de más estudios en Latinoamérica, donde se resalte la existencia y concentración de PFs en ambientes acuáticos y el inminente riesgo que su presencia representa para la salud pública.

Países de Europa y Asia se sitúan como líderes en la investigación biomédica, los laboratorios situados en estos continentes representan los mayores productores de fármacos, lo que justificaría el gran número de estudios realizados en relación con el impacto ambiental de dicha producción. Lati-

PRODUCTOS FARMACÉUTICOS			
COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	PAÍS	REFERENCIA
Acetaminofén	106.970 ng/L	Kenia	35
Sulfametaxazol	53.828 ng/L	Mozambique	
Ibuprofeno	17.600 ng/L	Sud África	
Ciprofloxacina	14.331 ng/L	Sud África	
Ciprofloxacina	8.3 ng/L	China	48
	14.2 ng/L	Unión Europea	
	135 ng/L	USA	
Ciprofloxacina	31.000 µg/L	Norte de India y Sur de India	49
Ciproflaxocina	200 a 600 ng/L	Canadá	37
Ibuprofeno	1440 ng/L	España	35
Acetaminofén	1289 ng/L	España	
Diclofenaco	18 a 49 ng/L	España	50
	34 a 145 ng/L	Argentina	51
	230 ng/L	China	52
	15 ng/L	Korea del Sur	53
	48 ng/L	Norte de la India	49
	0.26–1.49 ng/L	España	54
Acetaminofén	41.3 ng/L	China	48
	10.8 ng/L	USA	
	80.1 ng/L	Unión Europea	
Acetaminofén, ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, ácido salicílico y diclofenaco	0.5 a 41 µg/L	España	55
Acetaminofén	1890 mg/L	USA	56
	46.600 ng/L	Colombia	4
	31.2 a 38.9 ng/L	Arabia Saudita	36
	2143 ng / L	Taiwán	57
	2.200 a 92.000 ng/L	Canadá	37
	1.13–20 / µg L	España	54
	Menor a 4-485.5 ng / L	Singapur	58
Ácido acetil salicílico	261 a 4700 ng/L	Tailandia	59
	3.10–27 µg /L	España	54
Cafeína	23,778 a 1744 ng/L	Reino Unido	23
	7.21 µg /Kg	España	60
	307 a 2550 ng/L	Tailandia	59
	290 ng/L	USA	56
	4900 ng/L	USA	28
	9800 ng/L	USA	61
	2.11 ng / L	España	62
	3113 ng / L	Taiwán	57
	5928 ng/L	Costa Rica	4
	1,100,000 ng/L	Ecuador	4
	5,597,000 ng/L	China	48
	215 ng/L	Unión Europea	48

Tabla 1. Un resumen sobre la presencia de compuestos farmacéuticos reportados con mayor frecuencia en ambientes de agua dulce.

	249.6 ng/L	USA	48
	56 a 65 µg / L	India	63
	33.9-2980 ng / L	Singapur	58
Cafeína	2590 a 16500 ng/L	Arabia Saudita	43
Diclofenaco sódico	84.6 ng/L	Chile	4
Cafeína	8 a 15,000 ng/L	Chile	
Azitromicina	24 ng/L	España	64
	1100 ng/L	Croacia	35
	210 a 290 ng/L	Canadá	37
Carbamazepina	5000 ng/L	USA	61
	420 mg/L	USA	56
	2,11 ng / L	USA	62
	7.9 ng/L	China	48
	34.9 ng/L	Unión Europea	48
	70.7 ng/L	USA	48
	1670 ng/L	España	35
	240 a 1200 ng/L	Arabia Saudí	43
Ácido clofibrico	104 a 109 ng/L	Taiwán	22
Codeína	1275 a 372 ng/L	Reino Unido	23
	12 ng/L	España	64
	214 mg/L	USA	56
	260 a 940 ng/L	Canadá	37
Codeína, ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco indometacina	25 a 900 ng/L; 1 a 7 µg/L	España	35
Naproxeno	59.300 ng/L	Sud África	35
Diclofenaco	152 a 185 ng/L	Taiwán	22
	121 ng/L	USA	61
	Mayor a 5040 ng/L	USA	28
	460 ng/L	Arabia Saudí	43
Dihidrocodeína	226 a 118 ng/L	Reino Unido	23
Efedrina	476 a 35 ng/L	Reino Unido	23
Gemfibrozil	6 ng/g	España	64
	269.4 ng/L	China	48
	11.1 ng/L	Unión Europea	48
	681.7 ng/L	USA	48
	119 ng / L	USA	62
	26 a 430 ng/L	Arabia Saudí	43
	0.16 a 2.120 µg / L	España	54
Hidroclorotiazida	6 ng/g	España	64
Ibuprofeno	724 a 2200 ng/L; 552 a 1600 ng/L	Taiwán	22
	13 ng/g	España	64
	702 ng/L	Tailandia	39
	Mayor a 1200 ng/L	USA	28
	1200 ng/L	USA	61
	49.9 ng/L	China	48
	93.8 ng/L	Unión Europea	48
	488 ng/L	USA	48
	26.45 µg/L	India	49
	17.600 ng/L	Sud África	35

Tabla 1. Un resumen sobre la presencia de compuestos farmacéuticos reportados con mayor frecuencia en ambientes de agua dulce.

	17,600 ng/L	Sud África	35
	1763 ng / L	Taiwán	57
	510 a 8600 ng/L	Canadá	37
	1260 ng/L	Arabia Saudi	43
	2.28–39.80 µg /L	España	54
Ibuprofeno, naproxeno, ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido tolfénico y ácido flufenámico	90 a 4000 ng/L	Venezuela	4
Ketoprofeno	128 a 184 ng/L; 68 a 128 ng/L	Taiwán	22
Ácido mefenámico	251 ng/L	Tailandia	59
Morfina	371 a 59 ng/L	Reino Unido	23
Naproxeno	11.2 µg/kg	España	60
	49.9 ng/L	USA	62
	59.3 ng/L	Sud África	35
	580 a 6280 ng/L	Canadá	37
	105 q 310 ng/L	Arabia Saudi	43
	0.27 a 3.58 µg /L	España	54
Nicotina	3919 a 85 ng/L	Reino Unido	23
Nortramadol	397 a 144 ng/L	Reino Unido	23
Propranolol	3.37 µg/kg	España	60
Ácido salicílico	9.49 µg/kg	España	60
	10 ng/L a 100 a 200 ng/L	España	55
	274 ng/L	Costa Rica	4
	5 a 838 ng / L	Singapur	58
Sulfametoxazol	252 ng/L	USA	61
	Mayor a 1900 ng/L	USA	28
	8.11 ng/L	USA	62
	0.14 ng/L	Bolivia	4
	10.1 ng/L	China	48
	56.6 ng/L	Unión Europea	48
	115 ng/L	USA	48
	136 (3.8-407) ng/L	Korea del Sur	57
Sulfametaxazol	160 a 570 ng/L	Canadá	37
	145 a 730 ng/L	Arabia Saudi	43
Carbamazepina, Venlafaxina, O-desmetilvenlafaxina, Sulfametoxazol, Etinilestradiol.	Menor a 20 ng/L	Ecuador	65
Tetraciclinas	6 ng/L	España	64
	9.4 a 53 ng/L	Canadá	37
Tramadol	1122 a 738 ng/L	Reino Unido	23
	1 ng/L	China	48
	53.9 ng/L	Unión Europea	48
	152.2 ng/L	USA	48
Trimetoprima y Sulfametoxazol	18 a 70 mg/L	USA	56
Trimetoprima	11.383 ng/L	Kenia	35
	5 ng/L	China	48
	9.2 ng/L	Unión Europea	48
	52.4 ng/L	USA	48
	4.73 ng / L	USA	62
	170 a 240 ng/L	Canadá	62
	10 a 41 ng/L	Arabia Saudi	43

Tabla 1. Un resumen sobre la presencia de compuestos farmacéuticos reportados con mayor frecuencia en ambientes de agua dulce.

	10 a 41 ng/L	Arabia Saudi	43
Paroxetina	120 mg/L	USA	56
Dimetilxantina	20 400 a 1200 ng/L	Reino Unido	23
Diclofenaco sódico	30 ng/L	Argentina	4
	335 ng/L	Bolivia	
	0.04 ng/L	Brasil	
	103 ng/L	Uruguay	
	3.70 ng / L	USA	
Triclocarbán	2.6 ng/L	China	48
	21 ng/L	Unión Europea	
	14 ng/L	USA	
	75 a 260 ng/L	Arabia Saudi	
	4.01 ng/L	USA	
Fluoxetina	14.7 ng/L	China	48
	5.1 ng/L	Unión Europea	
	14.6 ng/L	USA	
Triclosán	250 a 845 ng/L	Arabia Saudi	43
Atenolol	1634 ng / L	Taiwán	57
	105 a 2210 ng/L	Arabia Saudi	43
Primidona	645 a 3000 ng/L	Arabia Saudi	43

Tabla 1. Un resumen sobre la presencia de compuestos farmacéuticos reportados con mayor frecuencia en ambientes de agua dulce.

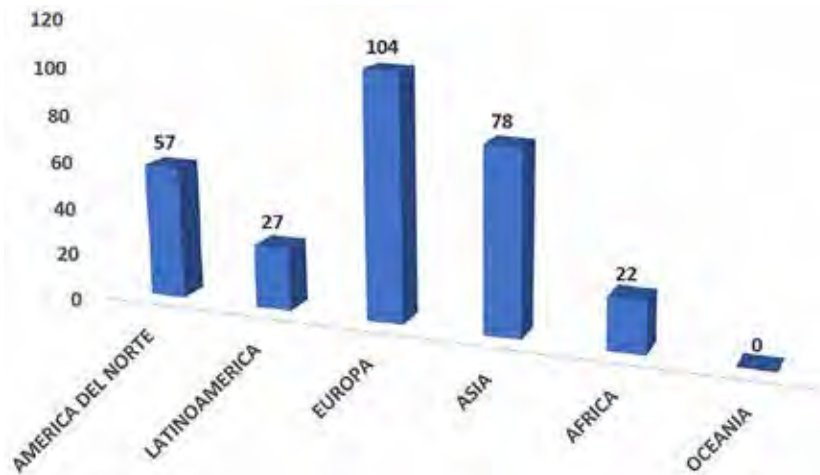
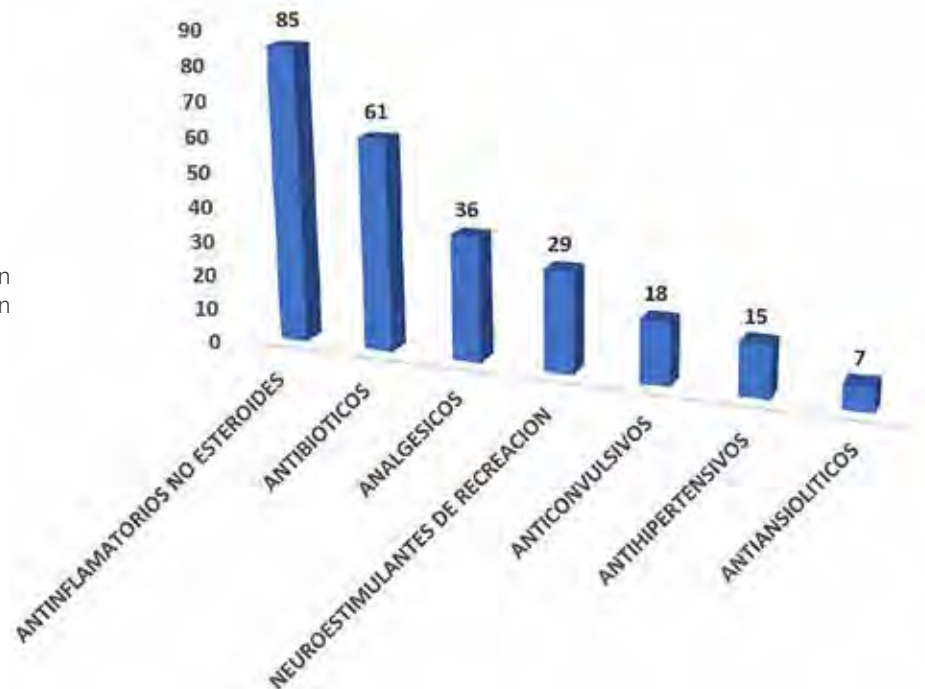


Figura 1. Discriminación de la presencia de PF en sistemas acuáticos según el continente.

Figura 2. Discriminación de PF en medios acuáticos de acuerdo con el tipo de fármaco.



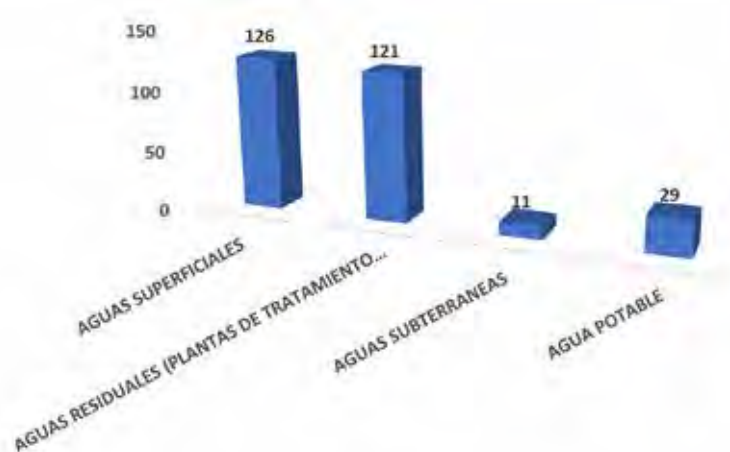


Figura 3. Distribución de fármacos en diferentes sistemas acuáticos en el ámbito mundial.

noamérica no reporta estudios en agua potable, sin embargo, de los reportes realizados en otras partes del mundo se puede deducir la existencia de compuestos farmacéuticos en aguas para el consumo. Es necesario el estudio del agua potable en Latinoamérica para determinar las concentraciones de fármacos existentes y así implementar soluciones para su remoción efectiva.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), representan el grupo farmacológico con mayor incidencia a nivel mundial, su presencia ha sido reportada en estudios en todos los continentes a excepción de Oceanía. De este grupo los fármacos más representativos son el Ibuprofeno y el Ketoprofeno. Los antibióticos representan el segundo grupo con mayor presencia a nivel mundial, dentro de los más comunes se incluye el Sulfametoxazol. De este punto, se puede hacer referencia la creciente resistencia que presentan muchas bacterias a los antibióticos y que en los últimos años ha ido en aumento representando un grave riesgo para la salud pública, dado que en algunos años muchas bacterias perjudiciales para el ser humano no podrán ser controladas por los antibióticos existentes. El porcentaje de neuroestimulantes o drogas de recreación detectado en los sistemas acuáticos alrededor del mundo es preocupante. La cafeína lidera este grupo de fármacos seguido de la nicotina y otras drogas de recreación. Se detectaron en total 29 referencias de presencia de neuroestimulantes en esta revisión.

El mayor número de estudios reportan presencia de contaminantes emergentes como fármacos de diferentes clases en aguas superficiales, incluyendo lagos, ríos y manantiales. La mayor fuente de ingreso de fármacos en los sistemas acuáticos proviene de las aguas residuales que recogen aguas domésticas, efluentes hospitalarios y efluentes de fábricas no debidamente tratadas antes de ser liberadas a ríos y mares. Las aguas residuales representan el segundo medio acuático con mayor presencia de fármacos como contaminantes emergentes. Registros demuestran la presencia de fármacos en el agua potable, un total de 29 referencias fueron identificadas a lo largo de esta revisión. Un tema preocupante debido al contacto directo al que el ser humano está expuesto de diferentes contaminantes farmacéuticos y a concentraciones no conocidas. La presencia de contaminantes farmacéuticos en aguas subterráneas podría explicar la existencia de estos en aguas potables, debido a que estos pueden filtrarse del suelo hacia las tuberías de flujo. Los PFs fueron detectados incluso en aguas de cisterna a mayores concentraciones, lo que reforzaría esta teoría.

Riesgo ambiental de los PFs

La presencia de compuestos farmacéuticamente activos (CFA) en el medio acuático se conoce desde mediados del siglo XX. Sin embargo, en los últimos años, con el advenimiento de nuevas tecnologías analíticas y después de minuciosos estudios sobre los impactos ecológicos de los CFA, su presencia se ha convertido en una preocupación emergente. Los productos farmacéuticos están diseñados para mejorar la salud humana y animal, sin embargo, inclusive los productos farmacéuticos más beneficiosos en niveles traza y con una exposición prolongada puede tener efectos nocivos sobre la salud humana, la vida acuática y otros ecosistemas, debido a su pseudopersistencia y su actividad biológica^{15,66,67}. Productos farmacéuticos como ibuprofeno, paracetamol, naproxeno, diclofenaco, sulfametoxazol, trimetoprima, ciprofloxacina, triclosán, fluoxetina, estrona, 17 β -estradiol y estriol presentaron concentraciones más altas que sus niveles de ecotoxicidad. Los compuestos identificados con niveles medidos de concentración ambiental (MEC) en África fueron hasta 7850 veces que los puntos finales de toxicidad⁶⁸. La contaminación del agua por PFs puede suceder de varias maneras, como por las descargas de aguas residuales domésticas a través del alcantarillado, aguas residuales tratadas, descargas de las industrias productoras de los PFs, escorrentías de lixiviados^{2,5,16}. La presencia de PFs en el ambiente acuático preocupa por su persistencia, la bioacumulación, la toxicidad y la creación de resistencia a antibióticos de muchos microorganismos, entre otras consecuencias aún no estudiadas en el ambiente acuático².

Los PFs se consideran contaminantes pseudopersistentes y se han detectado más de 160 productos en bajas concentraciones del orden de ng/L y μ g/L, en diferentes ambientes acuáticos hasta la fecha². Una revisión realizada por (67), ha demostrado que muchos productos farmacéuticos, incluyendo analgésicos, antibióticos, diuréticos, hormonas y antihistamínicos, están presentes en diferentes tipos de agua que fluyen hacia el mar Mediterráneo, cuyos niveles de contaminación de los medicamentos alcanzan cientos de ng/L en aguas residuales, mientras que los niveles en las aguas superficiales naturales están en el rango de decenas de ng/L. Ciertos PFs pueden bioacumularse en peces y otras especies acuáticas. Se ha encontrado que algunos PFs producen impactos en la reproducción y cambios histopatológicos en el pez cebra¹⁰. En otro estudio realizado en la Laguna del Mar Menor (España), se detectaron hasta 17 productos farmacéuticos en salmonete gris dorado (*Liza aurata*) y goby negro (*Gobius niger*) a concentraciones similares o inferiores a las reportadas en los peces

del río Suquía (Argentina). Asimismo, las concentraciones de carbamazepina en peces del río Suquía (hasta 33 ng/gd.w.) fueron similares a las reportadas en carpa común (*Cyprinus carpio*) del lago Taihu en China^{47,51}.

Una toxicidad dramática causada por el ganado expuesto al diclofenaco fue reportada desde Pakistán por la infortunada disminución de la población de buitres que se alimentaban de ellos. Concentraciones en el rango de 0,051 a 0,643 µg /g se encontraron en los riñones de 25 buitres que se encontraron muertos debido a una insuficiencia renal completa⁶. También se ha notificado la presencia del antibiótico ciprofloxacino (hasta 795 µg/kg) en la planta acuática *Echinodorus amazzonicus* en un microcosmos simulado⁶. En la red fluvial de Bangkok, los cocientes de peligro para el ácido acetilsalicílico, ciprofloxacino, diclofenaco y ácido mefenámico en la mayoría de los canales y el de ciprofloxacino en el río, fueron mayores o cercanos a 1, lo que sugiere riesgos ecológicos potenciales⁵⁹. La evaluación del riesgo debido a la distribución y aparición de compuestos farmacéuticos en el lago Dongting, China, mostró que los detectados con mayor frecuencia fueron cafeína, carbamazepina, diclofenaco, N,N-dietil-meta-toluamida (DEET), ibuprofeno, fluoxetina y ácido mefenámico. Sus concentraciones estaban en el rango de 2,0 y 80,8 ng/L⁶⁹. Se detectó la presencia de antibióticos y de sus metabolitos en cuatro tipos de hortalizas cultivadas comercialmente en el norte de España, como son hojas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), coliflores fluorescentes (*Brassica oleracea* L.) y semillas de habas (*Vicia faba* L.). Estos cultivos fueron regados con agua de un río que recibía descargas de aguas residuales. La ingesta prolongada de estos productos podría afectar negativamente a la salud⁷⁰.

Algunos estudios sobre el comportamiento ambiental y las tecnologías de monitoreo y control de PFs sugieren que deben implementarse estrategias para evaluar las toxicidades crónicas y agudas para poder establecer sus potenciales riesgos ecológicos y para la salud, considerando que la mayoría de fuentes de agua del mundo aún no han sido estudiadas^{3,10,11,69,70}.

Es importante señalar, que a pesar de que los PFs han sido hallados frecuentemente en diversos medios y que están generando afectaciones en los ecosistemas acuáticos, aún no se cuenta con la regulación ambiental necesaria en el ámbito global. La Unión Europea, Los Estados Unidos y Canadá lideran la inclusión de regulaciones para la vigilancia y control de PFs. Los países latinoamericanos no han trabajado todavía sobre normativa para el control de los PFs en el agua^{73,74}.

Asimismo, por la gran importancia ambiental de la presencia de PFs en el agua, en los últimos años se ha investigado sobre diferentes tratamientos aplicables a aguas residuales que contienen PFs, cuyo método principal es la tecnología fisicoquímica que incluye técnicas como la flotación, adsorción de carbón activado, procesos avanzados de oxidación, membrana de separación, coagulación y sedimentación. En teoría, luego del tratamiento secundario, las aguas residuales farmacéuticas no deben ser tratadas por métodos biológicos debido a su poca biodegradabilidad, sin embargo, este método tiene ventajas como el bajo costo, su amigabilidad con el ambiente y su potencial aceptación social^{75,76}.

Perspectivas para investigaciones futuras

Es necesario realizar más estudios de productos farmacéuticos para determinar sus fuentes de contaminación, así como los riesgos asociados al ambiente, salud humana y vida acuática en los países en desarrollo, debido a que existen pocos datos para África, y América del Sur en comparación con

Europa, Asia y América del Norte. Por lo que resulta imprescindible investigar sobre técnicas y tecnologías sostenibles de tratamiento para la eliminación eficiente de estos contaminantes emergentes y de esta forma disminuir el impacto a los ecosistemas acuáticos y a la salud humana. Es necesario trabajar con equipos de alta sensibilidad para determinar la presencia de productos farmacéuticos en los diferentes medios (aguas residuales, aguas superficiales, aguas subterráneas y agua potable) con la finalidad de lograr su identificación y caracterización de forma más exacta.

Conclusiones

Se ha podido determinar que, en el ámbito mundial existe evidencia científica de la presencia de productos farmacéuticos en aguas residuales, aguas superficiales, aguas subterráneas y agua potable. Las principales fuentes de ingreso de productos farmacéuticos a los ecosistemas acuáticos constituyen las aguas residuales que recolectan aguas servidas, aguas residuales industriales, efluentes hospitalarios y efluentes veterinarios no tratados adecuadamente previo a su descarga a lagos, lagunas, manantiales, ríos y mares.

Los antiinflamatorios no esteroides (AINES), representan el grupo farmacológico con mayor incidencia alrededor del mundo, seguido por los antibióticos, dentro de los más comunes se incluyen al ibuprofeno, ketofreno y Sulfametoxazol. Se reportan evidencias de un inminente riesgo ambiental por la presencia de compuestos farmacéuticos en ecosistemas acuáticos, debido a la bioacumulación, persistencia o toxicidad para la flora y fauna acuáticas. La importancia de la investigación científica radica en la propuesta de alternativas al generar conocimiento desde la investigación básica conformando grupos serios y comprometidos con el estudio de contaminantes emergentes como la presencia y consecuencia de los productos farmacéuticos en el agua.

Referencias bibliográficas

1. Kermia, A. E. B., Fouial-Djebbar, D. & Trari, M. Occurrence, fate and removal efficiencies of pharmaceuticals in wastewater treatment plants (WWTPs) discharging in the coastal environment of Algiers. *Comptes Rendus Chim.* 19, 963–970 (2016).
2. Ebele, A. J., Abou-Elwafa Abdallah, M. & Harrad, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerg. Contam.* 3, 1–16 (2017).
3. Liu, J. L. & Wong, M. H. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review on environmental contamination in China. *Environ. Int.* 59, 208–224 (2013).
4. Peña-Guzmán, C. et al. Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. *J. Environ. Manage.* 237, 408–423 (2019).
5. Gogoi, A. et al. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundw. Sustain. Dev.* 6, 169–180 (2018).
6. Kalia, V. C. Pharmaceutical and personal care product contamination: a global scenario. *Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/b978-0-12-816189-0.00002-0
7. Küster, A. & Adler, N. Pharmaceuticals in the environment: Scientific evidence of risks and its regulation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, (2014).
8. Miller, T. H., Bury, N. R., Owen, S. F., MacRae, J. I. & Barron, L. P. A review of the pharmaceutical exposome in aquatic fauna. *Environ. Pollut.* 239, 129–146 (2018).
9. Zhang, Z. et al. Discharge inventory of pharmaceuticals and personal care products in Beijing, China. *Emerg. Contam.* 2, 148–156 (2016).

10. Yang, Y., Ok, Y. S., Kim, K. H., Kwon, E. E. & Tsang, Y. F. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Sci. Total Environ.* 596–597, 303–320 (2017).
11. Zhao, W., Guo, Y., Lu, S., Yan, P. & Sui, Q. Recent advances in pharmaceuticals and personal care products in the surface water and sediments in China. *Front. Environ. Sci. Eng.* 10, (2016).
12. Bu, Q., Wang, B., Huang, J., Deng, S. & Yu, G. Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: A review. *J. Hazard. Mater.* 262, 189–211 (2013).
13. Cizmas, L., Sharma, V. K., Gray, C. M. & McDonald, T. J. Pharmaceuticals and personal care products in waters: occurrence, toxicity, and risk. *Environ. Chem. Lett.* 13, 381–394 (2015).
14. Acuña, V. et al. Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environ. Int.* 85, 327–333 (2015).
15. Majumder, A., Gupta, B. & Gupta, A. K. Pharmaceutically active compounds in aqueous environment: A status, toxicity and insights of remediation. *Environ. Res.* 176, 108542 (2019).
16. Kallenborn, R., Brorström-Lundén, E., Reiersen, L. O. & Wilson, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Arctic environments: indicator contaminants for assessing local and remote anthropogenic sources in a pristine ecosystem in change. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 33001–33013 (2018).
17. Sui, Q. et al. Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review. *Emerg. Contam.* 1, 14–24 (2015).
18. Sim, W. J. et al. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere* 82, 179–186 (2011).
19. Schaidt, L. A., Rudel, R. A., Ackerman, J. M., Dunagan, S. C. & Brody, J. G. Pharmaceuticals, perfluorosurfactants, and other organic wastewater compounds in public drinking water wells in a shallow sand and gravel aquifer. *Sci. Total Environ.* 468–469, 384–393 (2014).
20. Li, W., Shi, Y., Gao, L., Liu, J. & Cai, Y. Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. *Chemosphere* 89, 1307–1315 (2012).
21. Xie, Z. et al. Occurrence, bioaccumulation, and trophic magnification of pharmaceutically active compounds in Taihu Lake, China. *Chemosphere* 138, 140–147 (2015).
22. Fang, T.-H., Nan, F.-H., Chin, T.-S. & Feng, H.-M. The occurrence and distribution of pharmaceutical compounds in the effluents of a major sewage treatment plant in Northern Taiwan and the receiving coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 1435–1444 (2012).
23. Baker, D. R. & Kasprzyk-Hordern, B. Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: New developments. *Sci. Total Environ.* 454–455, 442–456 (2013).
24. Zhou, J. & Broodbank, N. Sediment-water interactions of pharmaceutical residues in the river environment. *Water Res.* 48, 61–70 (2014).
25. Olatunde, J. O., Chimezie, A., Tolulope, B. & Aminat, T. T. Determination of pharmaceutical compounds in surface and underground water by solid phase extraction-liquid chromatography. *J. Environ. Chem. Ecotoxicol.* 6, 20–26 (2014).
26. Oluwatosin, O., Adekunle, B., Obih, U. & Arne, H. Quantification of pharmaceutical residues in wastewater impacted surface waters and sewage sludge from Lagos, Nigeria. *J. Environ. Chem. Ecotoxicol.* 8, 14–24 (2016).
27. Fang, W., Peng, Y., Muir, D., Lin, J. & Zhang, X. A critical review of synthetic chemicals in surface waters of the US, the EU and China. *Environ. Int.* 131, 104994 (2019).
28. Brausch, J. M., Connors, K. A., Brooks, B. W. & Rand, G. M. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 218. 218, (2012).
29. Paíga, P. et al. Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation. *Sci. Total Environ.* 573, 164–177 (2016).
30. Lai, W. W. P., Lin, Y. C., Tung, H. H., Lo, S. L. & Lin, A. Y. C. Occurrence of pharmaceuticals and perfluorinated compounds and evaluation of the availability of reclaimed water in Kinmen. *Emerg. Contam.* 2, 135–144 (2016).
31. Kibuye, F. A. et al. Fate of pharmaceuticals in a spray-irrigation system: From wastewater to groundwater. *Sci. Total Environ.* 654, 197–208 (2019).
32. Sharma, B. M. et al. Health and ecological risk assessment of emerging contaminants (pharmaceuticals, personal care products, and artificial sweeteners) in surface and groundwater (drinking water) in the Ganges River Basin, India. *Sci. Total Environ.* 646, 1459–1467 (2019).
33. Jiang, Y. et al. Occurrence, seasonal variation and risk assessment of antibiotics in Qingcaosha reservoir. *Water (Switzerland)* 10, (2018).
34. Balakrishna, K., Rath, A., Praveenkumarreddy, Y., Guruge, K. S. & Subedi, B. A review of the occurrence of pharmaceuticals and personal care products in Indian water bodies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 137, 113–120 (2017).
35. Fekadu, S., Alemayehu, E., Dewil, R. & Van der Bruggen, B. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. *Science of the Total Environment* 654, (2019).
36. Shraim, A. et al. Analysis of some pharmaceuticals in municipal wastewater of Almadinah Almunawarah. *Arab. J. Chem.* 10, S719–S729 (2017).
37. Guerra, P., Kim, M., Shah, A., Alaei, M. & Smyth, S. A. Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/anti-inflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes. *Sci. Total Environ.* 473–474, 235–243 (2014).
38. Semerjian, L., Shanableh, A., Semreen, M. H. & Samarai, M. Human health risk assessment of pharmaceuticals in treated wastewater reused for non-potable applications in Sharjah, United Arab Emirates. *Environ. Int.* 121, 325–331 (2018).
39. Kwarciak-Kozłowska, A. Removal of pharmaceuticals and personal care products by ozonation, advance oxidation processes, and membrane separation. *Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/b978-0-12-816189-0.00007-x
40. Rivera-Jaimes, J. A. et al. Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 613–614, 1263–1274 (2018).
41. Gamarra, J. S., Godoi, A. F. L., de Vasconcelos, E. C., de Souza, K. M. T. & Ribas de Oliveira, C. M. Environmental Risk Assessment (ERA) of diclofenac and ibuprofen: A public health perspective. *Chemosphere* 120, 462–469 (2015).
42. Lin, H. et al. Mass loading and emission of thirty-seven pharmaceuticals in a typical municipal wastewater treatment plant in Hunan Province, Southern China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147, 530–536 (2018).
43. Alidina, M. et al. The occurrence of emerging trace organic chemicals in wastewater effluents in Saudi Arabia. *Sci. Total Environ.* 478, 152–162 (2014).
44. Rasheed, T., Bilal, M., Nabeel, F., Adeel, M. & Iqbal, H. M. N. Environmentally-related contaminants of high concern: Potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment. *Environ. Int.* 122, 52–66 (2019).
45. Batt, A. L., Furlong, E. T., Mash, H. E., Glassmeyer, S. T. & Kolpin, D. W. The importance of quality control in validating concentrations of contaminants of emerging concern in source and treated drinking water samples. *Sci. Total Environ.* 579, 1618–1628 (2017).
46. Yang, Y., Ok, Y. S., Kim, K. H., Kwon, E. E. & Tsang, Y. F. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Science of the Total Environment* 596–597, (2017).
47. Llorca, M. et al. Review of emerging contaminants in aquatic biota from Latin America: 2002–2016. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 1716–1727 (2017).
48. Fang, W., Peng, Y., Muir, D., Lin, J. & Zhang, X. A critical review of synthetic chemicals in surface waters of the US, the EU and China. *Environ. Int.* 131, 104994 (2019).
49. Philip, J. M., Aravind, U. K. & Aravindakumar, C. T. Emerging contaminants in Indian environmental matrices – A review. *Chemosphere* 190, 307–326 (2018).

50. Carmona, E., Andreu, V. & Picó, Y. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. *Sci. Total Environ.* 484, 53–63 (2014).
51. Valdés, M. E., Amé, M. V., Bistoni, M. de los A. & Wunderlin, D. A. Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *Sci. Total Environ.* 472, 389–396 (2014).
52. Ma, R. et al. Characterization of pharmaceutically active compounds in Dongting Lake, China: Occurrence, chiral profiling and environmental risk. *Sci. Total Environ.* 557–558, 268–275 (2016).
53. Yoon, Y., Ryu, J., Oh, J., Choi, B.-G. & Snyder, S. A. Occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea). *Sci. Total Environ.* 408, 636–643 (2010).
54. Gracia-Lor, E., Sancho, J. V., Serrano, R. & Hernández, F. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere* 87, 453–462 (2012).
55. Gros, M., Petrović, M., Ginebreda, A. & Barceló, D. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environ. Int.* 36, 15–26 (2010).
56. Fram, M. S. & Belitz, K. Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California. *Sci. Total Environ.* 409, 3409–3417 (2011).
57. Lai, W. W.-P., Lin, Y.-C., Tung, H.-H., Lo, S.-L. & Lin, A. Y.-C. Occurrence of pharmaceuticals and perfluorinated compounds and evaluation of the availability of reclaimed water in Kinmen. *Emerg. Contam.* 2, 135–144 (2016).
58. You, L. et al. Investigation of pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting chemicals in a tropical urban catchment and the influence of environmental factors. *Sci. Total Environ.* 536, 955–963 (2015).
59. Tewari, S., Jindal, R., Kho, Y. L., Eo, S. & Choi, K. Major pharmaceutical residues in wastewater treatment plants and receiving waters in Bangkok, Thailand, and associated ecological risks. *Chemosphere* 91, 697–704 (2013).
60. Martín, J., Santos, J. L., Aparicio, I. & Alonso, E. Multi-residue method for the analysis of pharmaceutical compounds in sewage sludge, compost and sediments by sonication-assisted extraction and LC determination. *J. Sep. Sci.* 33, 1760–1766 (2010).
61. Lapworth, D. J., Baran, N., Stuart, M. E. & Ward, R. S. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environ. Pollut.* 163, 287–303 (2012).
62. Dodgen, L. K. et al. Characterizing pharmaceutical, personal care product, and hormone contamination in a karst aquifer of southwestern Illinois, USA, using water quality and stream flow parameters. *Sci. Total Environ.* 578, 281–289 (2017).
63. Anumol, T., Vijayanandan, A., Park, M., Philip, L. & Snyder, S. A. Occurrence and fate of emerging trace organic chemicals in wastewater plants in Chennai, India. *Environ. Int.* 92–93, 33–42 (2016).
64. Osorio, V., Larrañaga, A., Aceña, J. & Pérez, S. Concentration and risk of pharmaceuticals in freshwater systems are related to the population density and the livestock units in Iberian Rivers. *Sci. Total Environ.* 540, 267–277 (2016).
65. Voloshenko-Rossin, A. et al. Emerging pollutants in the Esmeraldas watershed in Ecuador: Discharge and attenuation of emerging organic pollutants along the San Pedro-Guayllabamba-Esmeraldas rivers. *Environ. Sci. Process. Impacts* 17, 41–53 (2015).
66. Richardson, S. & A. Ternes, T. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* 86, 2813–2848 (2014).
67. Desbiolles, F., Malleret, L., Tiliacos, C., Wong-Wah-Chung, P. & Laffont-Schwob, I. Occurrence and ecotoxicological assessment of pharmaceuticals: Is there a risk for the Mediterranean aquatic environment? *Science of the Total Environment* 639, (2018).
68. Fekadu, S., Alemayehu, E., Dewil, R. & Van der Bruggen, B. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. *Sci. Total Environ.* 654, 324–337 (2019).
69. Ma, R. et al. Characterization of pharmaceutically active compounds in Dongting Lake, China: Occurrence, chiral profiling and environmental risk. *Sci. Total Environ.* 557–558, 268–275 (2016).
70. Tadić, Đ. et al. Occurrence and human health risk assessment of antibiotics and their metabolites in vegetables grown in field-scale agricultural systems. *J. Hazard. Mater.* 401, 123424 (2021).
71. Qin, Q., Chen, X. & Zhuang, J. The fate and impact of pharmaceuticals and personal care products in agricultural soils irrigated with reclaimed water. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45, 1379–1408 (2015).
72. Weissinger, R. H., Blackwell, B. R., Keteles, K., Battaglin, W. A. & Bradley, P. M. Bioactive contaminants of emerging concern in National Park waters of the northern Colorado Plateau, USA. *Sci. Total Environ.* 636, 910–918 (2018).
73. Caviedes, Diego., Delgado, D. Environmental normativity to regulate the presence of residual pharmaceutical products in aquatic environments. *Rev. Jurídica* 16, 121–130 (2017).
74. Jose, J., Sandra Pinto, J., Kotian, B., Mathew Thomas, A. & Narayana Charyulu, R. Comparison of the regulatory outline of ecopharmacovigilance of pharmaceuticals in Europe, USA, Japan and Australia. *Sci. Total Environ.* 709, 134815 (2020).
75. Su, R. et al. Treatment of Antibiotic Pharmaceutical Wastewater Using a Rotating Biological Contactor. *J. Chem.* 2015, (2015).
76. Guo, Y., Qi, P. S. & Liu, Y. Z. A Review on Advanced Treatment of Pharmaceutical Wastewater. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 63, (2017).

Received: 20 Diciembre 2020

Accepted: 15 Enero 2021

REVIEW / ARTÍCULO DE REVISIÓN

Amphibian chytridiomycosis, a lethal pandemic disease caused by the killer fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*: New approaches to host defense mechanisms and techniques for detection and monitoring

Génesis L. Romero-Zambrano¹, Stalin A. Bermúdez-Puga¹, Alex F. Sánchez-Yumbo¹, Jomira K. Yáñez-Galarza¹, H. Mauricio Ortega-Andrade^{2,3}, and Leopoldo Naranjo-Briceño^{1,4*}

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.28

Abstract: Chytridiomycosis is a catastrophic disease currently decimating worldwide amphibian populations, caused by the panzootic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. Massive species decline to extinction catalyzes radical changes in ecosystems globally, including the largest continuous rainforest ecosystem on Earth, the Amazon rainforest. Innovative research that aims to propose feasible mechanisms of mitigation and the origins of the disease is vital, including studies addressing climatic effects on the expansion of chytridiomycosis. Thus, this publication aims to provide a comprehensive review of: i) the current technologies used for *B. dendrobatidis* detection and monitoring, and ii) the known Neotropical amphibian's skin microbiota with anti-fungal properties against *B. dendrobatidis*. Several immunologic and DNA-based methods are discussed to understand the emerging fungal pathogens and their effects on the biosphere, which can help to mitigate the devastating ecological impacts of mass amphibian morbidity. The establishment of rapid and highly accurate *B. dendrobatidis* detection techniques and methods for monitoring amphibian's cutaneous microbiome is crucial in the fight against chytridiomycosis.

Key words: Amphibia, chytrid fungi, skin microbiome, environmental DNA, Next Generation Sequencing.

Introduction

Chytridiomycosis (hereafter, Chyt) is a devastating fungal disease that affects amphibians and currently contributes to an ongoing loss of biodiversity in frogs, toads, and salamanders. Chyt is caused by the chytrid fungi *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) and *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal), which affects both larval and adult stages of amphibian development^{1,2}. In recent years, amphibian populations and distribution have declined due to various factors, including habitat variations, the introduction of invasive exotic species, unregulated commercial trade, and climate change³.

Massive amphibian deaths in pristine areas were first observed around 1990. Thirty years later, more than 500 species, or 41% of all amphibians, were considered to be extinct or near-extinction^{4,7}. As this is a recent phenomenon, studies examining the relationship between environmental change and the emergence of Chyt are needed. Home to many of the world's amphibians, the Amazon rainforest is of interest because of its immeasurable biodiversity and high susceptibility to climatic changes⁸. This review aims to outline current technologies and methods for Bd detection and monitoring. It also provides a comprehensive analysis of known Neotropical amphibians' skin microbiota, describing specific bacterial strains that produce anti-fungal metabolites inhibiting Bd growth.

This review examines the technologies developed by humans to assess this fungal disease and amphibians' unique self-defense features. Both contribute to a better understanding of the Chyt disease and the development of novel methods useful for identifying, monitoring, and mitigating the killer fungus.

Environmental controversies worldwide and impacts on Neotropical biodiversity

Amphibians play a pivotal role in ecosystem health due to their regulation of insect populations, which helps control agri-

cultural pests and prevent the transmission of diseases such as dengue, malaria, and Zika virus⁴. Amphibians have received further study regarding discovering novel bioactive chemicals for pharmacological applications as new analgesics, antimicrobial agents, and other pharmaceuticals^{4,5}.

Fungi are one of the largest eukaryotic kingdoms, containing 1.5 to 5 million species that inhabit every biogeographic zone on Earth. These organisms comprise a diverse group with various life cycles, metabolisms, and morphological characteristics⁹. Modern fungi evolved from a group of unicellular eukaryotes, and recent studies estimate that the fungal kingdom originated between 710 and 1,060 million years ago in the Precambrian period^{10,11}. Fungi have a broad impact on Earth's ecosystems through mutualism, parasitism and commensalism, decomposition, and the synthesis of unique biomolecules⁹.

Bd is the best-studied fungal species causing Chyt. As shown in Figure 1, Bd infection begins with the colonization of the host epidermis (Figure 1a), especially in keratin-forming tissue, as occurs in the inguinal region, feet, legs, and the oral disc in the larval stage. The most relevant morphological characteristic of *Chytridiomycota* fungi is that they produce asexual zoospores with a single flagellum. Generally, Bd has an endobiotic life cycle in which the fungus grows inside the host (Figure 1b). In this instance, the zoospores use their flagellum for motility. Once in contact with the amphibian's surface epidermis, the zoospores inhabit the skin and develop a germ tube that penetrates the host cell membrane to transfer genetic material. The distal end of the germinal tube then swells and produces a new intracellular chytrid talus and sporangium. This process is repeated, each time burrowing into deeper layers of the host's epidermis. Once fully penetrated, immature sporangia are transported to the skin surface. When the sporangia finally mature, discharge tubes release mature

¹ Biotechnology Engineering Career, Faculty of Life Sciences, Universidad Regional Amazónica Ikiám, Tena, Ecuador.

² Centro de Investigación Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Guayaquil, Ecuador.

³ Herpetology Division, Instituto Nacional de Biodiversidad (INABIO), Quito, Ecuador.

⁴ Applied Microbiology Group, Universidad Regional Amazónica Ikiám, Tena, Ecuador.

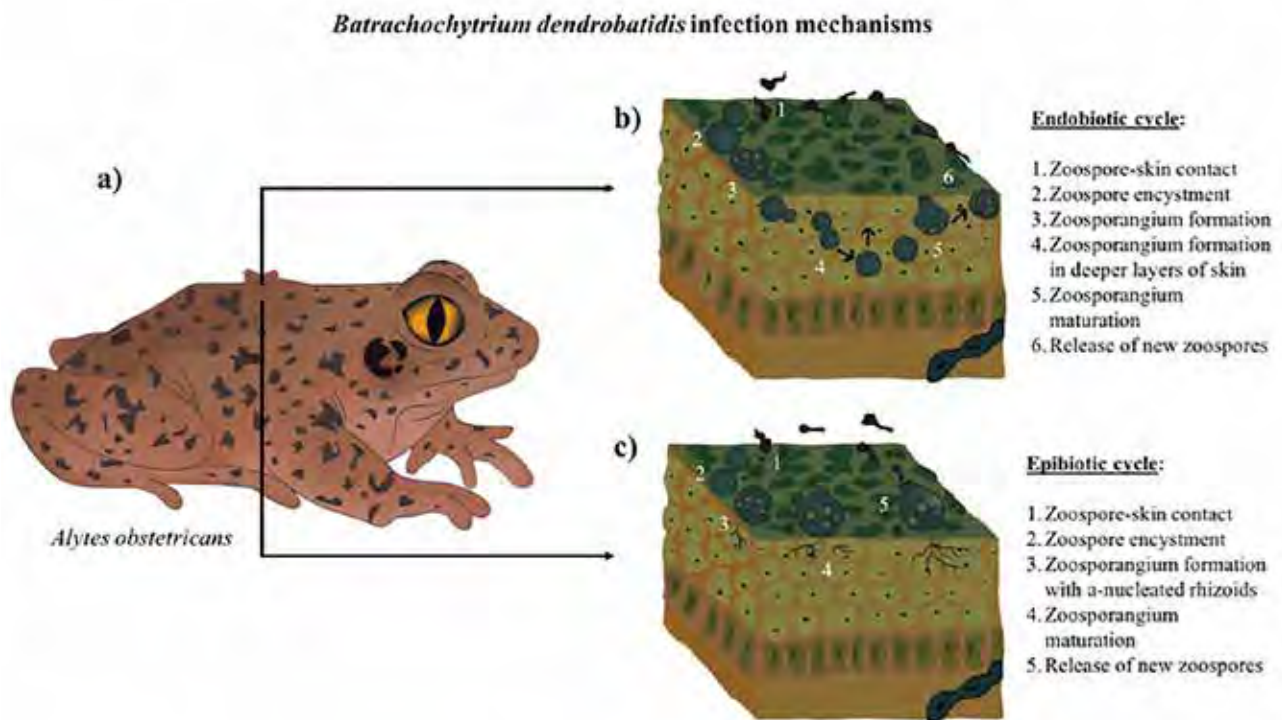


Figure 1. *Bd* infection mechanisms. (a) *Alytes obstetricans*, a small, stocky frog species belonging to Anura, family Alytidae (formerly Discoglossidae), (b) endobiotic cycle, and (c) epibiotic cycle.

zoospores into the environment to infect new individuals⁶. *Bd* can also have an epibiotic life cycle (Figure 1c), growing on the surface of the host's skin, where the zoospores are encysted and form anucleated rhizoids. The cyst matures in a zoosporangium and releases zoospores in a matter of only four days¹². At this time, Chyt disease develops and produces symptoms that include lethargy, depigmentation, or reddening of the skin, and severe cutaneous disorders that result in death⁶. Some amphibians are only carriers of the disease and can infect other animal classes, such as fishes¹³ and birds⁵. However, amphibians are the most vulnerable and suffer from the highest mortality rates.

Bd has been reported on every continent, except for Antarctica¹⁴. It was shown that *Bd* originated in Asia, from which multiple epizootic lineages have emerged¹⁵. It is hypothesized that the proliferation of Chyt results from uncontrolled global commerce of amphibians carrying the fungus. The trade of exotic wild animals remains without international regulation, posing an imminent risk that the disease may spread to other regions¹⁶.

The Neotropics consist of a vast region located from Mexico to southern South America, comprising biomes and habitats such as the Andes high-elevation grasslands and the Amazon rainforest¹⁷. The tropical Andes provide ideal *Bd* growth conditions, with annual temperatures ranging from 22-24 °C¹⁸. Likewise, the Amazon rainforest is characterized by having optimal environmental conditions for fungal growth due to its high relative humidity and tropical temperature¹⁹. Considering that both regions are home to the most extraordinary amphibian species richness globally, *Bd*'s spread would be devastating²⁰. It's presence has already been reported in Amazonian amphibian populations in Colombia, Brazil, and Ecuador²⁰⁻²². However, a lack of research still exists studying the prevalence of Chyt in the Amazon rainforest. This does not imply the non-existence of *Bd* and amphibian populations could be at significant risk.

New developments in *Bd* identification and monitoring techniques

Management of the disease requires early and accurate detection methods^{23,24}. Many diagnostic assays are based on PCR techniques, while a few others have focused on antibody and environmental DNA (eDNA) detection. These approaches are summarized in Table 1.

PCR-based detection

Between 1999 and 2005, *Bd* detection techniques were based on histological analysis³². These analyses were inadequate for *Bd* detection because of the long time and high skill required to extract quality tissues³³. In 2005, PCR-based methods began to be implemented, specifically quantitative PCR (qPCR), with a suitable sensitivity to detect *Bd*³⁴. Since 2009, other variant PCR techniques like nested-PCR, singlicate-PCR, pooled DNA + qPCR, and Oxford nanopore technology has been developed.

qPCR allows enough sensitivity for *Bd* detection, and the method of sample collection plays a key role. qPCR samples are collected by a non-invasive sampling technique called "swabbing." Samples can also be collected in a destructive manner using the tissue extraction method^{35,36}. In 2006, qPCR was used to detect *Bd* in *Rana subaquavocalis* tadpoles from Arizona, USA. Samples of 200 tadpoles were taken by swabbing mouthparts and buccal tissue extraction before DNA isolation²⁵. qPCR results showed a *Bd* prevalence of 41 % with destructive sampling methods, while swab samples showed only 21 %. Despite the decreased sensitivity of swab sampling, these results indicate that qPCR can detect *Bd* in both sampling methods. To improve the *Bd* detection rate, the authors recommend increasing the number of swab samples per frog to ensure similar reliability to destructive sampling. However, swab samples are useless for qPCR in the early stages of infection³².

Technique	Genus	Species	Type of sample	Prevalence (%)	Reference
qPCR	<i>Rana</i>	<i>R. subaquavocalis</i>	Swab	21	25
qPCR	<i>Rana</i>	<i>R. subaquavocalis</i>	Tissue	41	25
Nested-PCR	<i>Bombina</i>	<i>B. orientalis</i>	Filtered water	46	26
qPCR	<i>Litoria</i>	<i>L. pearsoniana</i>	Swab	31.7	27
Single-qPCR	<i>Litoria</i>	<i>L. pearsoniana</i>	Swab	31.5	27
qPCR	-	-	eDNA	87.5	28
Real time qPCR	<i>Rana</i> <i>Rana</i> <i>Rana</i> <i>Lithobates</i>	<i>R. sierra</i> <i>R. muscosa</i> <i>R. draytonii</i> <i>L. catesbeianus</i>	eDNA	66.7	29
mAb-EFL	<i>Alytes</i>	<i>A. obstetricans</i>	Swab	100	30
pAb-IPX	<i>Litoria</i>	<i>L. caerulea</i>	Tissue	62	31

Table 1. Bd identification techniques, types of sampling methods required, and their prevalence efficiency.

qPCR techniques can detect Bd when the infection level is high. However, it is crucial to detect the infection in its initial stages to manage it³⁷. Because of this, highly sensitive techniques such as Nested-PCR or qPCR on pooled DNA samples are useful. The sensitivity of Nested-PCR stems from the use of two PCR reactions, with the first reaction amplifying DNA that is then used as a template for a second PCR reaction³⁸. On the other hand, qPCR on pooled DNA uses the combination of several DNA samples in one, which allows more sensitivity in qualitative studies, where presence/absence is more critical than the amount (that is the case in the initial stages of infection)³⁹.

In 2014, the effectiveness of qPCR and nested-PCR techniques was compared using Bd zoospores filtered from an aquatic medium inhabited by infected *Bombina orientalis* frogs, originated from southern China³². A primary screening revealed that 20 % of the population was Bd-infected. Later, the infected frogs were placed in the same tanks as healthy individuals for six months. Swab samples were collected from ventral skin surfaces³². Bd analyses were performed by qPCR and nested-PCR. For nested-PCR, 5.8S ribosomal DNA was first amplified using Bd18SF1 and Bd28SR1 primers. Then ITS regions were amplified using the Bd1a and Bd2a primers. For qPCR, ITS1-3 Chytr and 5.8S Chytr primers were used. Nucleotide sequences, GC content (%), and melting temperature (°C) of each primer mentioned above are shown in Table 2. qPCR analysis revealed incongruent results in all samples studied. Frogs with positive results in water samples showed negative results on swab samples. The authors claim that these may have been caused by the low concentrations of the collected DNA. On the other hand, nested-PCR obtained congruent results in both samples. Lack of resolution analysis can be resolved by applying another type of sample, such as pooled DNA⁴⁰.

The size of the pool is an essential parameter in this type of sample. In 2018, Sabino-Pinto et al. analyzed the effective-

ness and cost of different pool sizes and loads on Bd detection using qPCR⁴². Researchers inoculated Bd zoospores suspensions in swabs (load sample) and combined them with different amounts of swabs with deionized water (pool size); these combinations are referred to as a pool. Each pool was inserted into a single vial for DNA extraction. The authors also made a cost analysis considering that the cost of DNA extraction of a single sample using a Qiagen kit is 20 € (~22 \$), and processing a full qPCR plate costs 52 € (~58 \$). So, the cost of processing 10 000 samples individually using Qiagen would be 200 000 € (~223 437 \$). If the same number of samples are processed in pools of two and four samples, costs will be 111 000 € (~124 005 \$) and 55 000 € (~61 444 \$), respectively. Results show that neither the pool size nor the load directly affected detecting Bd's presence or absence, so using larger pool sizes to reduce costs is possible.

Cost-effective alternatives have been developed by modifying pre-existing PCR protocols. Kriger, Hero & Ashton (2006) developed a modified qPCR protocol denominated singlicate-qPCR²⁷. This technique is based on a single analysis per sample instead of the three analyses employed by the conventional qPCR procedure. Validation of this protocol was performed in 210 *Litoria pearsoniana* frogs. Swab samples were extracted from the dorsal, lateral, and ventral surfaces. Conventional qPCR was performed as a control for comparison. For singlicate-qPCR, swab samples were analyzed using the PreqMan Ultra protocol. Results showed a Bd prevalence of 31.7%, while singlicate-qPCR showed 31.5%, differing by only 0.2%. Statistical analysis showed no significant difference ($p=0.81$)²⁷.

eDNA-based techniques

Although swabbing is a non-invasive sampling technique, it requires catching individuals, which can be difficult for small amphibian populations or in inaccessible areas, elevating the

Primer Name	Nucleotide Sequences	GC (%)	TM (°C)	Reference
Bd18SF1	5'-TTTGTACACACCGCCCGTCGC-3'	62	58.3	26
Bd28SR1	5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3'	45	49.7	26
Bd1a	5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3'	53	51.1	26
Bd2a	5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3'	45	49.7	26
ITS1-3 Chytr	5' CCTTGATATAATAACAGTGTGCCATATGTC-3'	38	57.3	26
5.8S Chytr	5'-AGCCAAGAGATCCGTTGTCAA-3'	48	52.4	26
NS1short*	5'-CAGTAGTCATATGCTTGTC-3'	-	55	41
NS1rc*	3'-ACAAGCATATGACTACTG-5'	-	55	41

Table 2. The Nested-PCR technique used nucleotide sequences, %GC content, and melting temperature of Bd-identification primers. *Primers for Nanopore sequencing.

sampling effort. However, amphibians and other organism groups leave skin, mucous, and spores that remain on their habitat and where their DNA can be collected. This is eDNA, a resource used to detect organisms' presence to extract DNA from water, soil, and sediment⁴³. In their article, Kamoroff and Goldberg (2017) show how eDNA can be used for early Bd detection in the environment and predict fungi outbreaks for amphibians at risk of extinction. Taking lakes water samples and through qPCR, Bd presence was detected on 3 of 7 studied sites. Bd's frog die-off was observed one month later at the same three sites before mentioned and none on the remaining sites. This study highlights the technique potential for quick decision making in management and conservation strategies⁴⁴.

Sieber, Hartikainen and Vorburger (2020) evaluated an eDNA-based method for Bd detection and quantification on large-volume water samples by qPCR. They compared tap and mesocosm water varying spore concentrations. They detected an overall of 87.5% and a high sensitivity reaching to detect 1 spores/L – 100 spores/L, suggesting that false negative can be related to Bd spores' heterogeneous distributions on water due to encystment on surfaces. Also, they found that it was more likely to detect Bd in tap water samples since 19 of 24 mesocosm water samples showed qPCR inhibition. As an eDNA drawback, samples may also have other compounds that could act as PCR inhibitors. Being that DNA concentration on the water can be low, increasing the volume of water enhances detection probabilities. However, inhibitor concentrations also get increased²⁸.

Almost all techniques mentioned above are used to detect Bd at the laboratory level, which inevitably requires expensive equipment, refrigeration, costly reagents, and specialized personnel training⁴⁵. However, a field-based method is also necessary. Kamoroff, Goldberg and Grasso (2020) followed the rapid detection line testing an *in-situ* DNA extraction technique using a mobile handled real-time qPCR thermocycler. They performed an experiment with skin swabs and eDNA filtered water samples, contrasting a whole field-based versus a lab-based analysis. Bd was detected on all three sites using swab samples with both lab and field protocols. In contrast, with eDNA samples, the results using both protocols match only on one of the sites. DNA quantification was not successful neither from eDNA nor swab samples using the field protocol. As authors obtain favorable results on Bd detection, they

clarify that their field-based method should be improved, and the sensitivity must be increased to avoid false negatives. This study shows how Bd's presence can be proved on the field within 60 min, with a total cost of \$45²⁹.

DNA and RNA sequencing has reached an unprecedented level of accessibility with the advent of Oxford Nanopore Technologies (ONT), demonstrating its potential in clinical, biosecurity, and environmental analysis. The MinION device's low-cost equipment, small size, and ease of library preparation powered only by a laptop computer enable the portability for on-site whole genome sequencing (long reads 10-20 Gb of DNA sequence data) and data analysis in the field⁴⁶.

The first study on the pathogenic chytrid fungus Bd using a MinION device as high throughput sequencing technology was published in 2018¹⁵. Nanopore generated sequences with almost 99.85% of high-quality referenced data, with primers designed for ribosomal markers targeted to Chytridiomycota⁴¹. They reported the emergence of the Bd pathogen in the early 20th century through mitochondrial genome sequencing, coinciding with the expansion of amphibians' global commercial trade. East Asia was shown as a geographical hotspot, and intercontinental transmission is ongoing to this day.

Detection by antibodies

An alternative for easy, quick, and portable Bd detection is immunological techniques such as monoclonal antibodies (mAbs) and polyclonal antibodies (pAbs).

mAbs are specialized glycoproteins produced by the immune system that bind to target molecules with high specificity⁴⁷. In 2017, a lateral flow assay (LFA) was developed using the Bd-specific monoclonal antibody 5C4. For development, Bd lineages from Panama, South Africa, Korea, and Mallorca were used to ensure that LFA detected all of them. A solution was prepared containing Bd zoospores and zoosporangia to be injected in BALB/c mice. The antibody test line consisted of purified T-Gel 5C4 with a goat anti-mouse immunoglobulin M class IgM as an internal control³⁰. Bd antigen detection by LFA and qPCR was performed in the Chyt animal model *Alytes obstetricans* using swab sampling and 35 tissues of naturally infected amphibians. The animal model results were negative for control individuals in both tests, qPCR detected four of the five infected individuals, and LFA detected only one. Of the group of samples of naturally infected amphibians, LFA gave

positive results for all of eight individuals, in complete agreement with qPCR.

pAbs, meanwhile, are generated by an immune response in which multiple antibodies are produced against a wide variety of structures present in the target molecule⁴⁷. In contrast to mAbs, the use of pAbs shows high sensitivity for Bd detection in its initial infection stages. In 2002, the production of pAbs and their introduction in an immunoperoxidase test (IPX) was carried out as a sensitive diagnosis method. The antigen for immunization was obtained using Bd sporangia. The immunization process was carried out in rabbits and sheep, where serum was extracted with Bd antibodies. Sections of Bd culture and *Litoria caerulea* infected skin sections were used as positive controls, and test sheets incubated with normal serum or pre-bled serum as negative controls. In the IPX test for diagnostic evaluation, 55 fingers of slightly infected *L. caerulea* and 15 non-infected were used. Results were positive for 34 of 55 samples of infected frogs and 15 of 15 negative results for the control group³¹.

Despite the above-mentioned antibody-based techniques, there is another critical factor: Bsal. This is a pathogen closely related to Bd that, although found on some frog species, only develops Chyt clinical signals in salamanders. Bd and Bsal have conserved amino acid sequences. The reason why antibody-based assays cannot differentiate between them is that pAbs can cross-react, and even Bd-specific monoclonal antibody 5C4 binds to proteins from both³⁰. From this concern, another technique based on in situ hybridization (ISH) has been proved.

RNAScope ISH is a technology designed for amplifying target-specific signals within cells, leaving apart background noise. It is compatible with formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens and can be performed with chromogenic or fluorescent dyes⁴⁸. Ossiboff and their collaborators developed an automated dual-plex chromogenic RNAScope ISH to simultaneously detect and differentiate Bd and Bsal. For this, they made Bd and Bsal cultures using Bd ALKL1 and Bsal AMFP isolates. They designed two target-specific oligonucleotides (ZZ), complementary to Bd JEL 197, and Bsal AMFP 28S rRNA sequences. The assay was performed for both organisms in culture and formalin-fixed paraffin-embedded amphibian tissues, experimentally infected with Bd, Bsal, or both. Those tissues belonged to five salamander and one frog species, preserved in formalin between 2-364 days. Out of 35 trials in total, 33 detected and differentiated correctly Bd and/or Bsal presence, without inconsistencies in the controls. High sensitivity was observed for *Batrachochytrium* detection in animals with qPCR loads as low as 1.1×10^2 zoospores/microliter⁴⁹.

Good management of Bd requires early and fast detection techniques, as described above. Until now, there have been significant efforts to achieve this. However, there is still a need for new methods to deal with this problem. One of the emerging tools for this is the skin microbiome' study of infected frogs.

Role of the amphibian cutaneous microbiome

Microbiome refers to the habitat formed by microorganisms, their genomes, and the surrounding environment⁵⁰. The cutaneous microbiome of amphibians comprises cultivable and non-cultivable microorganisms. The microbiome is vital for protecting amphibians against Bd because of secondary metabolites produced by bacteria⁵¹. These compounds are reported as belonging to a group of anti-fungal metabolites that include 2,4-diacetylphloroglucinol, indole-3-carboxaldehyde and violacein⁵³ (Figure 2).

Bioassays are useful to determine the anti-fungal properties by studying the effect of these compounds on Bd's growth rate. Only two independent studies, Catenazzi *et al.* (2018) in Peru⁵⁴, and Bresciano *et al.* (2015) in Ecuador²¹ characterized the cultivable skin-bacterial diversity of amphibians from the tropical Andes. Interestingly, bacteria belonging to the genera *Janthinobacterium*, *Pseudomonas*, and *Serratia* were found in both countries. Their results indicate that the cutaneous microbiome components' inhibitory effects could correspond to bacterial anti-fungal metabolites instead of competition for resources between bacteria and Bd fungus.

Catenazzi *et al.*, (2018) isolated cultivable bacteria from eight frog species and analyzed their Bd inhibition potential⁵⁴. Results showed that *Pseudomonas entomophila* was the bacteria with the highest inhibition probability (78.04 %), while other non-identified species of this same genus showed a 55.96 % probability of inhibition. Cultivable bacterial diversity isolated from the cutaneous microbiome is as follows: *Pseudomonas* (55 %) > *Paenibacillus* (10 %) = *Rahnella* (10 %) = *Serratia* (10 %) > *Aeromonas* (5 %) = *Janthinobacterium* (5 %) = *Sphingobacterium* (5 %). Unfortunately, there were no studies conducted regarding the cutaneous microbiome of Amazon amphibians. Therefore, the scope of the problem and the biodiversity of autochthonous anti-Bd bacteria are yet unknown. Figures 3 and 4 show the prevalence of cultivable bacterial diversity found in several Andean's cutaneous microbiome amphibian species, which diverge in temporality despite being in the same geographical region⁵⁵. *Pseudomonas* is the most common genus isolated from all frog species studied. *Gastrotheca excubitor* reports the highest biodiversity of cultivable bacteria recorded to date. This finding explains why *G. excubitor* is the most resistant species to Bd-infection, suggesting a relationship between Chyt disease resistance and the bacterial biodiversity associated with its cutaneous microbiome⁵⁵.

It is also essential to consider that a fraction of the bacteria associated with the amphibian cutaneous microbiome is non-cultivable. Walke *et al.* (2011) proposed that almost 37% of the total bacterial diversity found in an amphibian's skin is non-cultivable⁵⁶. Bates *et al.* (2018) used 16S rRNA metabarcoding to study the bacterial skin community in *Alytes obstetricans*, native to the Pyrenees, on diverse Bd infection types during different life stages⁵⁷. In addition to uncovering the host bacterial population, they revealed that infection dynamics and the individual's life stage are essential factors in bacterial skin communities' configuration. Rebollar *et al.* (2018) used 16S rRNA gene amplicon sequencing and described the taxonomic composition of the cutaneous microbiome associated with Neotropical frog *Craugastor fitzingeri*, discovering *Pseudomonas* as the main component⁵⁸. These results demonstrate the effectiveness of the metagenomics tools in revealing the skin microbiome's functions and determining their defense role against fungal pathogens.

On the other hand, not all bacteria living on amphibian skin are beneficial for Bd resistance⁵⁹. *In vitro* tests showed that the *Microbacterium* genus could promote Bd growth since they can produce nutritive compounds for the pathogenic fungus. Thus, if *Microbacterium* is found in a more significant proportion in the amphibian's microbiome, it could help advance a developing Bd infection⁵⁹.

Some controversy exists as to whether cutaneous microbiome composition or the secretion of antimicrobial peptides is the amphibian Bd defense's main factor. A comparison between Bd-susceptible species *Gastrotheca nebulanastes* and the resistant specie *G. excubitor* was carried out in 2017⁵⁵. Inhibitory potentials of antimicrobial peptides secreted by both

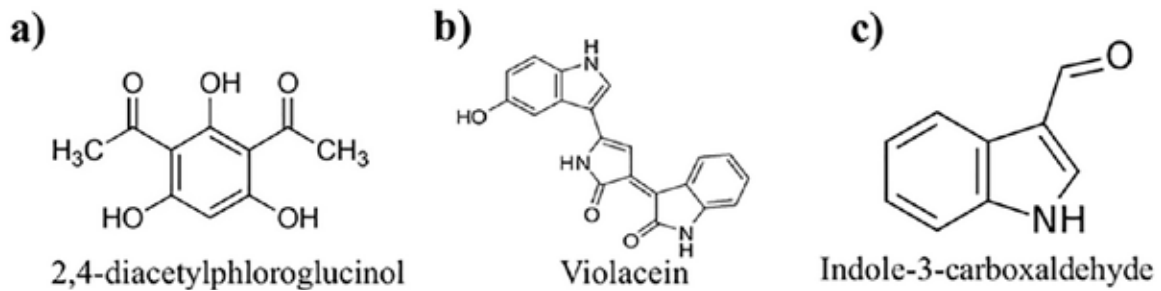


Figure 2. Anti-fungal metabolites (a) 2,4-diacetylchlorchlorucinol produced by *Lysobacter gummosus*, (b) indole-3-carboxaldehyde and (c) violacein produced by *Janthinobacterium lividum*.

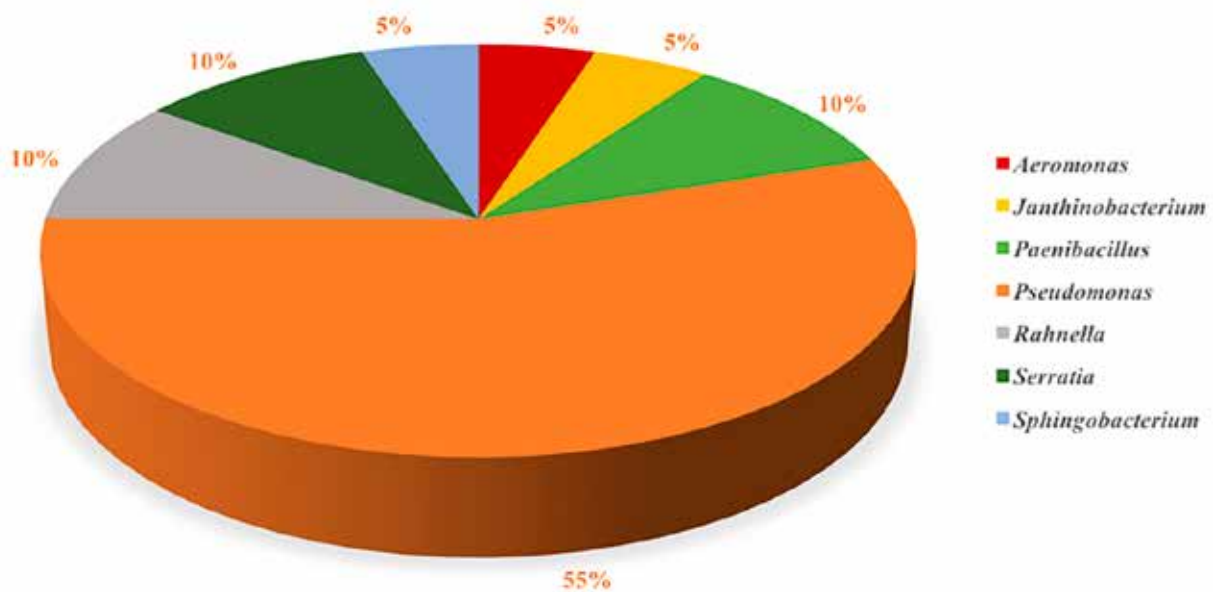


Figure 3. Distribution of anti-Bd bacterial genus isolated from the cutaneous microbiome of Andean amphibian species (Bresciano *et al.* 2015; Catenazzi *et al.* 2018).

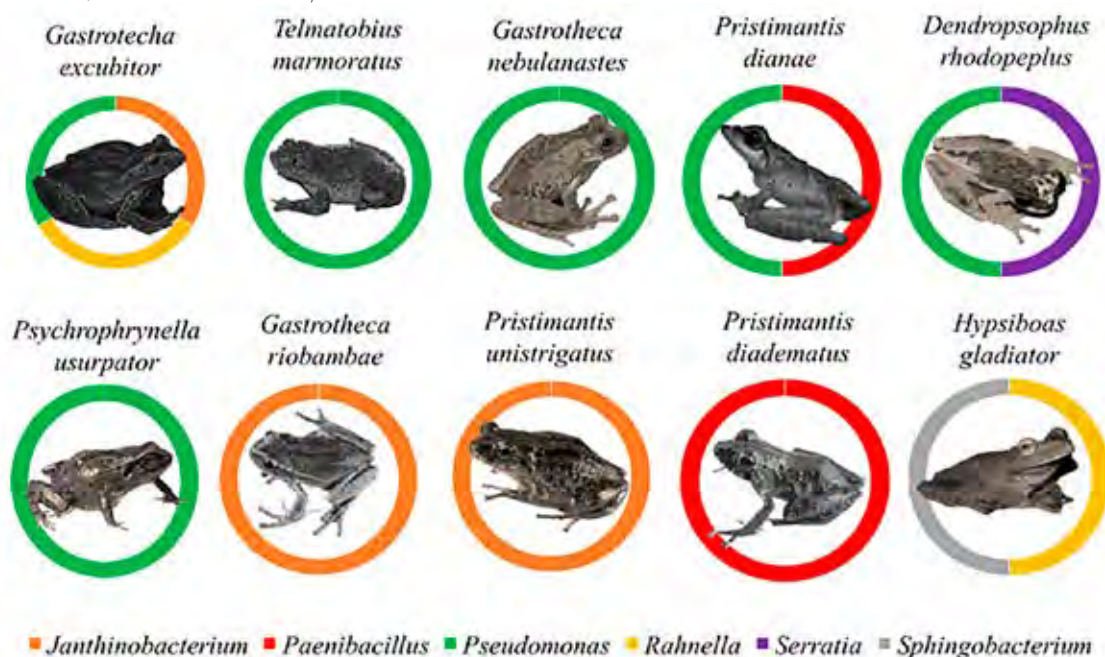


Figure 4. Prevalence of cultivable bacterial biodiversity found in the cutaneous microbiome of Andean amphibians. Note that the high prevalence of *Pseudomonas* genus is found in most frog species studied (in green color) and that *Gastrotheca excubitor* species have more cultivable bacterial biodiversity.

species showed no significant differences in anti-Bd activity⁵⁵. However, *G. excubitor* exhibited higher richness and abundance of anti-Bd bacteria in its cutaneous microbiome, which was the differentiating factor between the species. Contrarily, other authors described both antimicrobial peptides and the cutaneous microbiome as equally contributing to Andean amphibian species' survival⁶⁰. To better understand amphibians' applied resistance mechanisms against Bd, a clear need exists for other multi-, inter-, and transdisciplinary studies where numerous factors are considered.

Conclusions

Various Bd identification and monitoring techniques are evaluated and critiqued. The mAb test cannot provide positive results when Bd is in a basal state, which is a problem because early control measures are needed to decrease amphibian morbidity. In contrast, pAb offers high sensitivity for Bd detection in its initial infection stages. RNAScope technology allows the detection and differentiation of Bd and Bsal presence, but histological procedures and image analysis are still key challenges. Recent studies revealed that qPCR and nested-PCR are efficient techniques in different conditions. However, their use is limited because a large number of samples are required. qPCR can be used with a high quantity of swab samples, while nested-PCR allows the detection of Bd when the infection level is low. A viable alternative could be the use of nested-PCR for analysis of filtered water samples inhabited by frogs because this technique allows Bd detection even at low levels. Another option is to use pooled DNA samples with qPCR techniques since neither the load nor the pool size affects detectability. Hence, it is possible to pool several samples without the loss of resolution analysis and reducing costs.

The development of novel technologies allows reducing analytical costs while maintaining an acceptable level of sensitivity. Oxford Nanopore Technology sequencing distinguishes itself as a powerful high-throughput technology for in-field, real-time epidemiological studies focused on identifying emerging fungal pathogens in the wild. Furthermore, the development of new techniques using eDNA allows BD detection without even collecting study' individuals. In the last year, no effort has been spared to take the laboratory to the field, for which portable equipment such as real-time qPCR has been developed, which gives a perspective of how the analysis will look like in the future.

Amphibians use different strategies for resistance and resilience in fighting Bd infection. Secondary metabolites produced by amphibian skin-bacteria are suggested as adequate biological controls of the killer Bd fungus. For this reason, in-depth studies of autochthonous anti-Bd bacteria for the prevention and/or mitigation of Chyt are proposed. Assessment of the *Pseudomonas* genus is highly recommended because of its high prevalence and Bd-inhibition rate. The identification and evaluation mechanisms and the analysis of the skin microbiome reviewed in this article contribute to a better understanding of Chyt devastating disease caused by the Bd fungus and the resistance and resilience mechanisms used by amphibians for survival.

Abbreviations

Chyt: Chytridiomycosis; Bd: *Batrachochytrium dendrobatidis*; Bsal: *Batrachochytrium salamandrivorans*; PCR: polymerase chain reaction; ONT: Oxford Nanopore Technologies; pAbs: polyclonal antibodies; mAbs: monoclonal antibodies; LFA: lateral flow assay; qPCR: quantitative PCR.

Acknowledgments

We thank J. Luzuriaga for his technical and artistic assistance in the handmade drawing of Figure 1. Also, thanks to A. Naranjo and J. Kabir for their valuable grammatical support.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

No source of funding.

Bibliographic references

1. Bradley, P. W. et al. Shifts in temperature influence how *Batrachochytrium dendrobatidis* infects amphibian larvae. *PLoS one* 14, e0222237-e0222237, doi:10.1371/journal.pone.0222237 (2019).
2. Martel, A. et al. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, doi:10.1073/pnas.1307356110 (2013).
3. Fisher, M. & Garner, T. The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biology Reviews* 21, 2-9, doi:10.1016/j.fbr.2007.02.002 (2007).
4. De Sá, R. O. Crisis global de biodiversidad: importancia de la diversidad genética y la extinción de anfibios. *Agrociencia* 9, 513 (2005).
5. Hanlon, S. M., Henson, J. R. & Kerby, J. L. Detection of amphibian chytrid fungus on waterfowl integument in natural settings. *Diseases of aquatic organisms* 126, 71-74 (2017).
6. Piotrowski, J. S., Annis, S. L. & Longcore, J. E. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96, 9-15 (2004).
7. Scheele, B. C. et al. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science* 363, 1459-1463, doi:10.1126/science.aav0379 (2019).
8. Whitworth, A., Villacampa, J., Serrano Rojas, S. J., Downie, R. & MacLeod, R. Methods matter: Different biodiversity survey methodologies identify contrasting biodiversity patterns in a human modified rainforest — A case study with amphibians. *Ecological Indicators* 72, 821-832, doi:https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.08.055 (2017).
9. Choi, J. & Kim, S.-H. A genome Tree of Life for the Fungi kingdom. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 9391-9396, doi:10.1073/pnas.1711939114 (2017).
10. Watkinson, S. C. in *The Fungi* Vol. 3 (ed Sarah C. Watkinson) 89-203 (Elsevier, 2016).
11. Naranjo-Ortiz, M. A. & Gabaldón, T. Fungal evolution: cellular, genomic and metabolic complexity. *Biological Reviews* 000, 1-35, doi:10.1111/brv.12605 (2020).
12. James, T. Y. et al. Disentangling host, pathogen, and environmental determinants of a recently emerged wildlife disease: Lessons from the first 15 years of amphibian chytridiomycosis research. *Ecology and Evolution* 5, 4079-4097, doi:10.1002/ece3.1672 (2015).
13. Liew, N. et al. Chytrid fungus infection in zebrafish demonstrates that the pathogen can parasitize non-amphibian vertebrate hosts. *Nature Publishing Group* 8, 1-10, doi:10.1038/ncomms15048 (2017).
14. Miller, C. A. et al. Distribution modeling and lineage diversity of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) in a central African amphibian hotspot. *PLoS one* 13, 1-16 (2018).
15. O'hanlon, S. J. et al. Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science* 360, 621-627 (2018).
16. Kolby, J. E. & Daszak, P. The Emerging Amphibian Fungal Disease, Chytridiomycosis : A Key Example of the Global Phenomenon of Wildlife Emerging Infectious Diseases. *Emerging Infections* 4, 1-17, doi:10.1128/microbiolspec.EI10-0004-2015. Correspondence (2016).

17. Antonelli, A. et al. Amazonia is the primary source of Neotropical biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, 6034, doi:10.1073/pnas.1713819115 (2018).
18. Cabrera-condarco, W. H. Diversidad florística de un bosque montano en los Andes tropicales del noroeste de Bolivia. *Ecología en Bolivia* 40, 380-395 (2005).
19. Pacheco, A. M. & Scussel, V. M. Selenium and aflatoxin levels in raw Brazil nuts from the Amazon basin. *Journal of agricultural and food chemistry* 55, 11087-11092, doi:10.1021/jf072434k (2007).
20. Becker, C. G., Rodriguez, D., Lambertini, C., Toledo, L. F. & Haddad, C. F. B. Historical dynamics of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amazonia. *Ecography* 39, 954-960, doi:10.1111/ecog.02055 (2016).
21. Bresciano, J. C. et al. Variation in the Presence of Anti-Batrachochytrium dendrobatidis Bacteria of Amphibians Across Life Stages and Elevations in Ecuador. *EcoHealth* 12, 310-319, doi:10.1007/s10393-015-1010-y (2015).
22. McCracken, S., P. Gaertner, J., Forstner, M. & Hahn, D. Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians from the forest floor to the upper canopy of an Ecuadorian Amazon lowland rainforest. *Herpetological review* 40, 190-195 (2009).
23. Rooij, P. V., Martel, A., Haesebrouck, F. & Pasmans, F. Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions. *Veterinary Research* 46, 137, doi:10.1186/s13567-015-0266-0 (2015).
24. Walker, S. F. et al. Environmental detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in a temperate climate. *Diseases of aquatic organisms* 77, 105-112, doi:10.3354/dao01850 (2007).
25. Retallick, R. W. R., Miera, V., Richards, K. L., Field, K. J. & Collins, J. P. A non-lethal technique for detecting the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms* 72, 77-85, doi:10.3354/dao072077 (2006).
26. Shin, J., Bataille, A., Kosch, T. A. & Waldman, B. Swabbing often fails to detect amphibian chytridiomycosis under conditions of low infection load. *PLoS One* 9, e111091, doi:10.1371/journal.pone.0111091 (2014).
27. Kriger, K. M., Hero, J. M. & Ashton, K. J. Cost efficiency in the detection of chytridiomycosis using PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 71, 149-154, doi:10.3354/dao071149 (2006).
28. Sieber, N., Hartikainen, H. & Vorburger, C. Validation of an eDNA-based method for the detection of wildlife pathogens in water. *Dis Aquat Organ* 141, 171-184, doi:10.3354/dao03524 (2020).
29. Kamoroff, C., Goldberg, C. & Grasso, R. Rapid detection of the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) using in-situ DNA extraction and a handheld mobile thermocycler. *Authorea*, doi:10.22541/au.159363453.33681758 (2020).
30. Dillon, M. J. et al. Tracking the amphibian pathogens *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* using a highly specific monoclonal antibody and lateral-flow technology. *Microbial biotechnology* 10, 381-394, doi:10.1111/1751-7915.12464 (2016).
31. Berger, L. et al. Production of polyclonal antibodies to *Batrachochytrium dendrobatidis* and their use in an immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms* 48, 213-220 (2002).
32. Shin, J., Bataille, A., Kosch, T. A. & Waldman, B. Swabbing often fails to detect amphibian chytridiomycosis under conditions of low infection load. *PLoS One* 9, e111091, doi:10.1371/journal.pone.0111091 (2014).
33. Berger, L., Speare, R. & Kent, A. Diagnosis of chytridiomycosis in amphibians by histological examination. *Zoos' Print Journal* 15, 184-190, doi:10.11609/JoTT.ZPJ.15.1.184-90 (1999).
34. Annis, S. L., Dastoor, F. P., Ziel, H., Daszak, P. & Longcore, J. E. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases* 40, 420-428, doi:10.7589/0090-3558-40.3.420 (2004).
35. Clare, F., Daniel, O., Garner, T. & Fisher, M. Assessing the ability of swab data to determine the true burden of infection for the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *EcoHealth* 13, 360-367, doi:10.1007/s10393-016-1114-z (2016).
36. Waddle, A. W. et al. Systematic approach to isolating *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 127, 243-247, doi:10.3354/dao03203 (2018).
37. Bataille, A. et al. Genetic evidence for a high diversity and wide distribution of endemic strains of the pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild Asian amphibians. *Molecular Ecology* 22, 4196-4209, doi:10.1111/mec.12385 (2013).
38. Müller, H.-J. & Prange, D. R. in *PCR - Polymerase-Kettenreaktion* (eds Hans-Joachim Müller & Daniel Ruben Prange) 85-87 (Springer Spektrum, 2016).
39. Hellicar, A. D., Rahman, A., Smith, D. V. & Henshall, J. M. Machine learning approach for pooled DNA sample calibration. *BMC Bioinformatics* 16, 214, doi:10.1186/s12859-015-0593-1 (2015).
40. Sabino-Pinto, J., Martel, A., Pasmans, F., Steinfartz, S. & ... Pooling skin swabs does not inhibit qPCR detection of amphibian chytrid infection. *PLoS one* 14, e0214405 (2019).
41. Wurzbacher, C. et al. Introducing ribosomal tandem repeat barcoding for fungi. *Molecular Ecology Resources* 19, 118-127, doi:10.1111/1755-0998.12944 (2019).
42. Sabino-Pinto, J. et al. Detectability vs. time and costs in pooled DNA extraction of cutaneous swabs: A study on the amphibian chytrid fungi. *Amphibia Reptilia* 40, 29-39, doi:10.1163/15685381-20181011 (2019).
43. Chestnut, T. et al. Heterogeneous occupancy and density estimates of the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in waters of North America. *PLoS one* 9, e106790-e106790, doi:10.1371/journal.pone.0106790 (2014).
44. Kamoroff, C. & Goldberg, C. S. Using environmental DNA for early detection of amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* prior to a rapid die-off. *Dis Aquat Organ* 127, 75-79, doi:10.3354/dao03183 (2017).
45. Ghosh, P. N., Fisher, M. C. & Bates, K. A. Vol. 9 (2018).
46. Runtuwene, L., Tuda, J., Mongan, A. & Suzuki, Y. in *Single Molecule and Single Cell Sequencing*. Vol. 1129 (ed Suzuki Y) 143-150 (Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer, 2019).
47. Machado, N. P., Téllez, G. A. & Castaño, J. C. Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Infectio* 10, 186-197 (2006).
48. Wang, F. et al. RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Molecular Diagnostics* 14, 22-29, doi:10.1016/j.jmoldx.2011.08.002 (2012).
49. Ossiboff, R. J. et al. Differentiating *Batrachochytrium dendrobatidis* and *B. salamandrivorans* in Amphibian Chytridiomycosis Using RNAscope® in situ Hybridization. *Frontiers in Veterinary Science* 6, 1-10, doi:10.3389/fvets.2019.00304 (2019).
50. Marchesi, J. R. & Ravel, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 3, 31-31, doi:10.1186/s40168-015-0094-5 (2015).
51. Loudon, A. H. et al. Interactions between amphibians' symbiotic bacteria cause the production of emergent anti-fungal metabolites. *Frontiers in microbiology* 5, 441-441, doi:10.3389/fmicb.2014.00441 (2014).
52. Brucker, R. M. et al. The identification of 2,4-diacetylphloroglucinol as an anti-fungal metabolite produced by cutaneous bacteria of the salamander *Plethodon cinereus*. *Journal of Chemical Ecology* 34, 39-43, doi:10.1007/s10886-007-9352-8 (2008).
53. Brucker, R. M. et al. Amphibian chemical defense: Anti-fungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*. *Journal of Chemical Ecology* 34, 1422-1429, doi:10.1007/s10886-008-9555-7 (2008).
54. Catenazzi, A. et al. Widespread Elevational Occurrence of Anti-fungal Bacteria in Andean Amphibians Decimated by Disease: A Complex Role for Skin Symbionts in Defense Against Chytridiomycosis. *Frontiers in microbiology* 9, 465-465, doi:10.3389/fmicb.2018.00465 (2018).
55. Burkart, D., Flechas, S. V., Vredenburg, V. T. & Catenazzi, A. Cutaneous bacteria, but not peptides, are associated with chytridiomycosis resistance in Peruvian marsupial frogs. *Animal Conservation* 20, 483-491, doi:10.1111/acv.12352 (2017).

56. Walke, J. B., Harris, R. N., Reinert, L. K., Rollins-Smith, L. A. & Woodhams, D. C. Social Immunity in Amphibians: Evidence for Vertical Transmission of Innate Defenses. *Biotropica* 43, 396-400, doi:10.1111/j.1744-7429.2011.00787.x (2011).
57. Bates, K. A. et al. Amphibian chytridiomycosis outbreak dynamics are linked with host skin bacterial community structure. *Nature Communications* 9, 693-693, doi:10.1038/s41467-018-02967-w (2018).
58. Rebolgar, E. A. et al. The skin microbiome of the neotropical frog *Craugastor fitzingeri*: Inferring potential bacterial-host-pathogen interactions from metagenomic data. *Frontiers in Microbiology* 9, 466, doi:10.3389/fmicb.2018.00466 (2018).
59. Becker, M. H. et al. Phylogenetic distribution of symbiotic bacteria from Panamanian amphibians that inhibit growth of the lethal fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Molecular ecology* 24, 1628-1641, doi:10.1111/mec.13135 (2015).
60. Flechas, S. V. et al. Microbiota and skin defense peptides may facilitate coexistence of two sympatric Andean frog species with a lethal pathogen. *The ISME Journal* 13, 361-373, doi:10.1038/s41396-018-0284-9 (2019).

Received: 13 October 2020

Accepted: 10 November 2020

REVIEW / ARTÍCULO DE REVISIÓN

Bioproductos desarrollados a partir de micelio de hongos: Una nueva cultura material y su impacto en la transición hacia una economía sostenible

Fungal mycelium-bioproducts development: A new material culture and its impact on the transition to a sustainable economy

Kevin Feijóo-Vivas¹, Stalin A. Bermúdez-Puga¹ Hernán-Rebolledo², José Miguel Figueroa², Pablo Zamora^{2,3} & Leopoldo Naranjo-Briceño^{1,2,4}

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.29

Resumen: El biodiseño y biofabricación de biomateriales a partir de residuos vegetales lignocelulósicos y auto-generados por el micelio de hongos es un campo de investigación emergente desde las últimas dos décadas. Surge una nueva cultura material que se basa en los nuevos paradigmas de la fabricación alternativa partiendo de la lógica "de hacer crecer los nuevos materiales en lugar de extraerlos" e integrando los principios básicos de la economía circular y de la Biotecnología Material, asegurando la susceptibilidad de los mismos a ser biodegradados y volver a su estado original en la naturaleza. Su implementación a nivel industrial en distintas áreas de la manufactura comienza a competir con el cuero de origen animal, materiales y productos de origen petroquímico, a la vez que promueve nuevas alternativas de alimentos proteicos sustentables que contribuyan al cambio de los patrones de consumo humano de alto impacto ambiental arraigados a nivel global. La presente revisión, aborda una mirada particular que va desde lo molecular a lo global sobre la nueva cultura micelial, considerando aspectos generales del reino Fungi, la morfogénesis, composición química e integridad celular del micelio, los sistemas multienzimáticos extracelulares de degradación de lignocelulosa que poseen los hongos, pasando por los principales sustratos empleados, los biomateriales desarrollados a partir de micelio a nivel industrial, destacando los biotextiles, materiales y productos para el empaquetamiento y aislamiento, nuevas fuentes alimentarias basadas en el micelio, el arte y el diseño arquitectónico. Finalmente, se presenta el estado del arte actual de las empresas o laboratorios vanguardistas que suscitan una economía circular basada en el micelio de hongos a nivel mundial, al reemplazar recursos y productos de origen fósil por materiales amigables con el entorno, generando alternativas sostenibles y ciclos de producción con una baja demanda de energía y sin repercusiones al medio ambiente, es decir, promoviendo una nueva conciencia material.

1637

Palabras clave: Hongos, micelio, lignocelulosa, biomateriales, biofabricación, materiales compuestos, biotextiles, economía circular.

Abstract: The biodesign and biofabrication of self-generated biomaterials based on lignocellulosic plant residues and by fungal mycelium is an emerging field of research for the last two decades. A new material culture emerges based on the new paradigms of alternative manufacturing founded on the logic "of growing new materials instead of extracting them" that integrates the basic principles of the circular economy and Material Biotechnology, ensuring susceptibility of them to be biodegraded and returned to their original state in nature. Its implementation at an industrial level in different manufacturing areas begins to compete with animal origin-leather, materials, and petrochemical products while promoting new alternatives of sustainable protein foods that contribute to changing high human consumption patterns globally entrenched environmental impact. This review addresses a detailed overview from the molecular to the global of the new mycelial culture, considering general features about Fungi kingdom, the morphogenesis, chemical composition, and cellular integrity of the mycelium, the extracellular multi-enzymatic systems for the lignocellulose degradation, passing through the primary substrates used, the biomaterials developed from fungal mycelium at the industrial level; highlighting biotextiles, materials and products for packaging and insulation, new mycelium-based food sources, art, and architectural design. Finally, a current state-of-the-art of frontlines companies or laboratories promoting a circular economy based on fungal mycelium is addressed by replacing resources and fossil origin products with environmentally friendly materials, generating sustainable alternatives and production cycles with low energy demand and without environmental repercussions, that is to say, promoting a new material consciousness.

Key words: Fungi, mycelium, lignocellulose, biomaterials, biofabrication, composite materials, biotextiles, circular economy.

Introducción

Los materiales han estado presentes en cada paso de la historia de la humanidad, desde la utilización de materiales de origen natural en la Edad de Piedra, como la madera, lana, cuero y algodón, hasta el desarrollo de plásticos y otros polímeros sintéticos de origen petroquímico que marcaron tendencia durante el siglo XX. Sin embargo, aunado al crecimiento de la población mundial, la producción masiva de dichos materiales

muchas veces está asociado a impactos ambientales negativos, tanto a nivel local como global, ya que frecuentemente implican la generación de desechos tóxicos y contaminantes, un alto consumo de energía durante su producción, una liberación constante de gases de efecto invernadero a lo largo de toda su cadena de valor, el incremento de la temperatura atmosférica y concomitante cambio global¹. Bajo este contexto,

¹ Facultad de Ciencias de la Vida, Ingeniería en Biotecnología, Universidad Regional Amazónica Ikiám, Tena, Ecuador.

² Spora Biotech, Fundo Santa Paulina, Rosario, Rengo, Chile.

³ Vincula S&C, Las Condes, Región Metropolitana, Chile.

⁴ Grupo de Microbiología Aplicada, Universidad Regional Amazónica Ikiám, vía Muyuna, Tena, Ecuador.

algunos de los mayores desafíos de nuestra sociedad actual son la búsqueda de nuevas tecnologías verdes que promuevan la innovación y transición hacia una economía sostenible donde el empleo de los recursos naturales renovables y no renovables sea más responsable con el medio ambiente en procesos productivos de alta huella ecológica². En este sentido, el reino Fungi extiende su micelio para interconectarse al pensamiento crítico y lógico de empresas de base biotecnológica que reinventan sus paradigmas industriales en nuevas formas de economía circular basados en la Biotecnología Fúngica y Material.

Un sin número de productos con alto valor biotecnológico han surgido de la exploración del metabolismo de los hongos como es la obtención de aditivos alimentarios, compuestos bioactivos e interés farmacológico, pigmentos, biocombustibles, enzimas, vitaminas, aminoácidos, entre otros^{3,4}. La tendencia en la última década, aparte del desarrollo de cuerpos fructíferos o la producción de moléculas bioactivas con fines medicinales, es centrarse en el estudio del micelio de los hongos ya que ofrecen un tejido de nuevos enfoques de producción con alternativas sostenibles con impacto negativo en el ambiente⁵. Ahora, basados en los nuevos paradigmas de fabricación alternativa, que se siembran en "el crecimiento de materiales en lugar de extraerlos", el micelio fúngico propone a la economía una nueva generación de biomateriales sostenibles a partir de biomasa fúngica o de materiales compuestos por desechos orgánicos y micelio⁶. Las áreas de investigación y aplicación tecnológica de productos a base de micelio se mantienen en constante crecimiento y desarrollo obteniendo resultados eficientes, rentables y competitivos frente a materiales imperecederos de origen petroquímico, cueros de origen animal en la industria textil y como nuevas fuentes de alimento fomentando en este sentido a la economía circular⁷. En la actualidad, los productos a base de micelio están revolucionando las industrias del embalaje, textil, del cuero, de materiales de construcción para viviendas, muebles orgánicos y la automatización^{2,8}. Además, existe un especial interés en emplearlos para el aislamiento térmico y acústico, la protección contra incendios y nuevas fuentes de alimento con alto contenido en aminoácidos esenciales y proteínas^{9,10}. Sin embargo, la información disponible en la literatura aún es sesgada e incompleta y las empresas dedicadas a la nueva cultura micelial mantienen encriptadas las metodologías desarrolladas para la obtención de biomateriales de origen fúngico. Es por ello, que el presente artículo de revisión tiene como finalidad contribuir a revelar la simbiosis del reino Fungi asociada a la autogeneración de biomateriales a partir de residuos lignocelulósicos partiendo del micelio, como objeto y origen del todo, su morfogénesis, composición química e integridad celular y los sistemas multienzimáticos extracelulares de degradación de lignocelulosa. Además, aborda los principales biomateriales compuestos de micelio de hongos colocados en el mercado internacional y las empresas progresistas que los producen; así como la distribución de la propiedad intelectual asociada al desarrollo de biomateriales basados en el micelio de hongos.

Aspectos generales del reino Fungi

Los hongos son un grupo diverso y extendido de organismos eucariotas y ubicuos que agrupa a grandes rasgos a las levaduras, mohos y setas¹¹. Los hongos evolucionaron a partir del súper grupo Opisthokonta, un clado de organismos eucariotas y heterótrofos en el que coexisten los hongos verdaderos, animales vertebrados y protistas unicelulares flagelados. Opisthokonta alude a la presencia de células flageladas, ocupando el flagelo una posición posterior¹². Debido a la presencia

de un flagelo unicelular en las zoosporas y gametos de hongos de la división Chytridiomycota, así como en los espermatozoides de animales, Fungi se convierte en un reino evolutivamente más cercano al reino Animalia que al Plantae¹³.

En base a descubrimientos fósiles, los hongos terrestres más antiguos datan de aproximadamente 1080-890 millones de años. En mayo de 2019, microfósiles de un hongo microscópico del género *Ouraspahira* fueron hallados en lutitas de la formación Grassy Bay, en el Ártico canadiense, pertenecientes a la era geológica Mesoproterozoico (1200-1600 M.a.). Anterior a este descubrimiento, los fósiles más antiguos se conocían del periodo Silúrico y Devónico (420-350 M.a.) pertenecientes al género *Prototaxites* hallados en América del Norte, Norte de Europa (Reino Unido y Alemania), África del Norte y Asia Occidental (Arabia Saudita y Australia). Sus cuerpos fructíferos fueron los organismos terrestres más altos de ese tiempo, llegando a medir hasta alrededor de 1 metro de diámetro y 8.8 metros de altura^{14,15}.

Hasta la actualidad, sistemáticamente 144.000 especies fúngicas han sido nombradas y clasificadas. Sin embargo, se estima que el 93% de las especies son actualmente desconocidas para la ciencia. El número total de especies en la Tierra puede llegar a ser entre 2.2 y 2.8 millones según estimaciones basadas en estudios de ADN ambiental (eDNA), y el número aumenta si se ahonda en la diversidad de OTUs (por sus siglas en inglés, Operational Taxonomic Unit), el modelamiento de nichos ecológicos y en interpolaciones basadas en la riqueza global de especies¹⁶. Sin embargo, se estima que puede haber 5 millones de especies de hongos en todo el planeta.

Los hongos tienen ciclos de vida diversos y complejos, pueden reproducirse a partir de la producción de esporas (sexuales o asexuales) y/o la fragmentación de hifas. Durante el ciclo de vida sus células pueden ser haploides, diploides, dicarióticas o multicarióticas¹⁷. Además, muchos poseen un crecimiento indeterminado e indefinido, como es el caso de *Armillaria bulbosa*, un Basidiomiceto del género Agaricales, que por propagación asexual ha colonizado de micelio al menos 15 hectáreas de suelo forestal del bosque de frondosas del norte de Michigan, Estados Unidos. Pesa más de 10.000 kg y se ha mantenido genéticamente estable durante más de 1.500 años convirtiéndose en el organismo vivo más extenso y antiguo del planeta Tierra¹⁸.

El subreino Dikarya o hongos superiores alberga la división Ascomycota y Basidiomycota, sus taxones son homólogos por poseer células dicarióticas; resultantes de la fusión citoplasmática de células para la distribución de dos núcleos monocarióticos a células hijas resultantes de la mitosis. Es decir, albergan especies con células de más de dos núcleos¹⁹. En la presente revisión, solamente se hará referencia a los hongos superiores que son las más empleados en la fabricación de biomateriales basados en micelio de hongos.

Fisiología y diversidad de hongos superiores

Micelio, morfogénesis e integridad celular

El micelio es una red fibrosa de filamentos microscópicos interconectados y dinámicos bien desarrollado y perenne constituido por la extensión apical y fusión de hifas o anastomosis, filamentos tubulares y alargados que muestran una considerable plasticidad y versatilidad de desarrollo (Figura 1.b)²⁰. El micelio es el esqueleto del organismo ya que se encarga de conectar y trasladar rápidamente agua, azúcares y minerales formando un sistema cerrado en respuesta a estímulos o cambios en la composición del medio externo²¹. Dis-

tintas regiones interconectadas del micelio pueden mostrar actividades fisiológicas y bioquímicas diferentes simultáneamente o en distintos momentos, su respuesta variará según la especie y las condiciones nutricionales como micro ambientales locales^{20,22,23}. Cuando crecen en un sustrato heterogéneo, el desarrollo del micelio permanece difuso y se diferencian estructuras largas paralelas o rizomorfos²⁴. Mientras, en un entorno donde los nutrientes se distribuyen homogéneamente y en abundancia, el micelio puede llegar a presentar pigmentación, un crecimiento rítmico e incluso exhibir sectores morfológicos delgados como densos y producir estructuras aéreas⁹.

Según su función y estado del desarrollo, se reconocen dos tipos de micelio, el micelio vegetativo y aéreo. El micelio vegetativo usualmente habita el suelo, coloniza y se nutre de materia orgánica vegetal y animal viva (Ej. Hongos parasíticos), en descomposición (Ej. Hongos saprófitos) o tienen la capacidad de asociarse de manera mutualista (hongos endófitos y los formadores de micorrizas) (Figura 1.c)²⁵. Mientras que el micelio aéreo, a partir del sustrato colonizado por el micelio vegetativo, se proyecta hacia la superficie por la extensión apical y propagación ramificada de hifas aéreas, formando en sus puntas estructuras terciarias productoras de esporas asexuales y/o sexuales²⁶. El micelio aéreo también se reconoce como un estado reproductivo del hongo ya que asegura su supervivencia y la trascendencia de genes a nuevos hábitats (Figura 1.d)^{27,28}.

El micelio posee una gran resistencia mecánica e hidrofobicidad atribuida a una estructura celular circundante a la membrana plasmática, su pared celular^{21,31}. La pared celular fúngica cumple un rol fisiológico en la morfogénesis y en la

protección de la integridad del micelio^{13,32}. Durante el crecimiento celular del hongo, la célula contiene una mayor concentración de sales y azúcares generando un diferencial osmótico en relación al medio exterior e impulsando la entrada neta de agua a través de la membrana plasmática provocando su expansión celular³³. La membrana plasmática se presiona contra la superficie interna de la pared, lo que resulta en el desarrollo de presión hidrostática o turgencia³⁴. El aumento de la presión interna permite que la célula se acerque a una condición de homeostasis en la que la afluencia de agua coincide con el aumento del volumen celular que se produce durante su crecimiento. Es decir, la pared celular es una estructura muy dinámica y en constante crecimiento, que resiste la expansión en gran parte de su superficie. Además, se extiende en regiones específicas incluidas las puntas de las hifas (Figura 1.a)¹³.

Desde el punto de vista estructural, la pared de la célula fúngica es un compuesto macromolecular entrelazado y poroso ensamblado en la superficie de la membrana plasmática^{17,35}. De manera general, la pared celular se compone de polisacáridos, microfibrillas de quitina unidas covalentemente a polímeros lineales de glucanos y una variedad de glicoproteínas y lípidos. Junto a pequeñas cantidades de polifosfatos e iones inorgánicos, conforman la matriz extracelular (Figura 2)³⁶. La síntesis del polímero de quitina es catalizada por la quitina sintasa a partir de monómeros β -1,4-N-acetil-D-glucosamina. Entre moléculas de quitina adyacentes se ensamblan en matrices antiparalelas unidas por hidrógeno volviéndolas extremadamente insolubles, con una gran resistencia a la tracción, soportan el estrés y eliminan el agua de su estructura³⁷. Cuando la quitina se rompe, la célula pierde su estabilidad osmótica

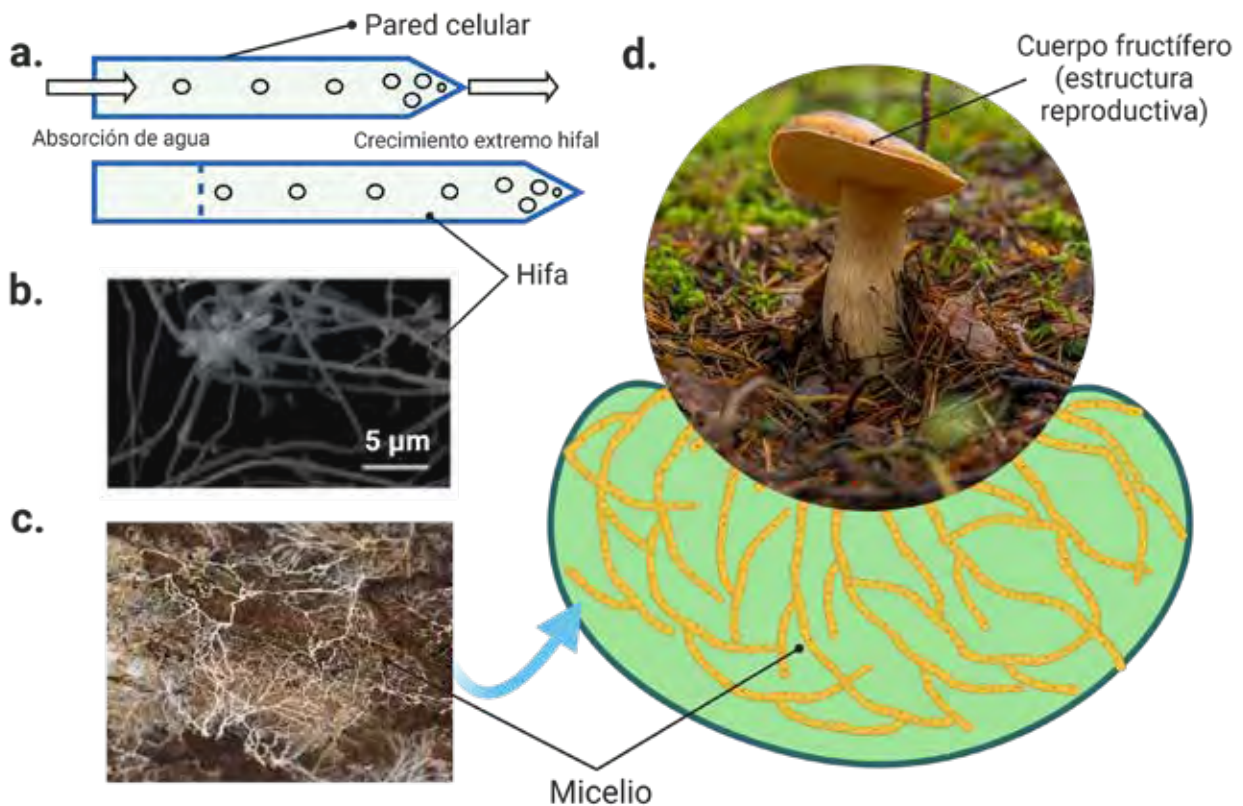


Figura 1. Biología y estructura de hongos superiores a. El crecimiento apical de hifas generado por la presión de turgencia inducida por un gradiente osmótico en el sitio de absorción de agua y la secreción de materiales extracelulares mediado por vacuolas²⁹. b. Micrografía SEM de *Ganoderma lucidum* sobre sustrato de celulosa a los 10 días de crecimiento 30.°C. Colonización micelial de un hongo de podredumbre blanca sobre sustrato de naturaleza lignocelulósica. "Mycelium" by Bushman. K is licensed under CC BY-NC 2.0 d. Esquema de la estructura reproductiva fúngica desarrollada a partir de la red micelial vegetativa. Diagrama creado por BioRender.com

y puede romperse. El β -1,3-glucano es a menudo el polímero de la pared celular más abundante. El enlace β -1,3-glicosídico en los glucanos retuerce el polímero y tres cadenas de glucano forman una triple hélice que se mantiene unida por enlaces de hidrógeno. Los β -1,3-glucanos están conectados con β -1,6-glucanos en la estructura de la pared madura para producir una red elástica de polímeros altamente ramificada³⁷.

Las proteínas estructurales en la pared celular son glicoproteínas con carbohidratos ligados a N y O. Estos incluyen a manoproteínas, que están glicosiladas con cadenas ricas en manosa, y otras glicoproteínas con manosa y residuos de galactosa. Las glicoproteínas de la pared celular están conectadas a la membrana plasmática mediante un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) y se reticulan con las microfibrillas de quitina y glucanos y cumplen funciones de señalización y transporte, participan en la fusión con otras células y funcionan en la adhesión a superficies, formación de biopelículas y patogénesis. También median la absorción de compuestos del entorno circundante y protege la célula de sustancias nocivas^{13,32}.

Análisis químicos de la composición de la pared celular han revelado que las proporciones relativas de quitina, glucanos y glicoproteínas varían según las características fisiológicas intrínsecas de la especie^{24,39}. La hidrólisis, generalmente ácida, de las paredes celulares de hongos que representan distintos taxones ha revelado que los azúcares más abundantes son las hexosas, en el siguiente orden de abundancia y distribución (Tabla 1): glucosa > glucosamina (producto hidrolítico

de la quitina y quitosano) > manosa > galactosa > galactosamina. También se han encontrado ácidos urónicos, principalmente ácido glucorónico, pentosas (arabinosa y ribosa) y desoxihexosas (principalmente fucosas)³². Así mismo, factores exógenos influyen en las concentraciones relativas de los componentes de la pared celular; como la edad del cultivo, las condiciones ambientales de crecimiento, el uso de medios sólidos y líquidos, las fuentes de nitrógeno y carbono, la concentración de iones, la temperatura, el pH, la iluminación, la adición de diferentes componentes, etc^{21,35}. Haneef y colaboradores, a través del cultivo de dos hongos Basidiomicetos de podredumbre blanca y productores del mismo tipo de enzimas, *Ganoderma lucidum* y *Pleurotus ostreatus*, fueron inoculados en sustratos de polisacáridos de celulosa pura y PDB (Potato Dextrose Broth) demostrando que las películas fibrosas de micelio presentan propiedades mecánicas y estructurales sintonizables y muy bien controladas dependiendo de los nutrientes del sustrato. El micelio se volvió más fibroso y rígido cuando se cultivó en celulosa pura. La celulosa pura es más compleja y difícil de digerir en comparación a la celulosa de PDB debido a la presencia de azúcares simples. La rigidez del micelio fue atribuida a una mayor síntesis de quitina para la penetración y degradación de la celulosa. Además de demostrar que pueden ser producidas en grandes cantidades y sobre amplias superficies³⁰.

Sistema multi-enzimático extracelular saprófito degradador de biomasa lignocelulósica

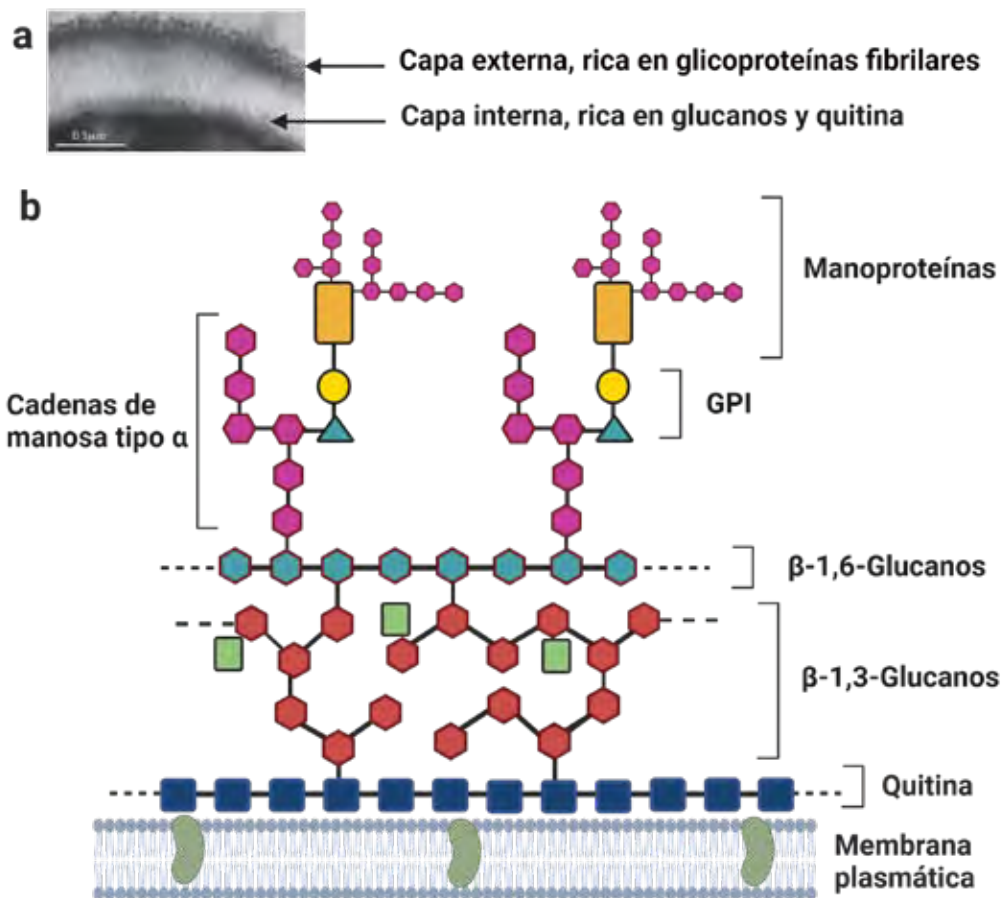


Figura 2. Composición química de la pared celular fúngica. a. Una sección de la pared celular de células de *Candida albicans* fijadas químicamente y capturadas por microscopía electrónica de transmisión (MEB). b. Vista esquemática de la organización modular general de la pared celular. Modificado de: Cassone, A., 2013. Development of vaccines for *Candida albicans*: fighting a skilled transformer. Nature Rev. Microbiol. 11, 884–891 38. Diagrama creado por BioRender.com

Grupo Taxonómico	Glc	Gal	GlcN	Mann	GalN	Glucur	Rham	Fuc	Xyl	Ara
Chitridiomycota	++	+	+++	tr	tr	0	tr	+/-	+/-	+/-
Zygomycota	+	+	+++	+	0	++	tr	+	0	0
Hemiascomycota	+++	+	+	+++	0	0	0	0	0	0
Euascomycota	+++	++	++	+	+	+	+/-	0	tr	tr
Heterobasidiomycota	+++	tr	+	++	0	+	0	tr	tr	tr
Homobasidiomycota	+++	+	++	+	tr	0	+	+	+	+

Tabla 1. Principales carbohidratos identificados en hidrolizados de paredes celulares de hongos.

Fuente: Ruiz-Herrera, J., 2012. *Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly*, Boca Raton, FL: CRC Press. Nota: tr = trazas; +/- = menos de 1%; + = 1.1-5%; ++ = 6-20%; +++ = más de 21% de azúcares totales presentes en la pared celular. Glc = glucosa; Gal = galactosa; GlcN = glucosamina (un producto de polisacáridos que contienen glucosamina o N-acetilglucosamina); Mann = manosa; GalN = galactosamina (un producto de polisacáridos que contienen galactosamina o N-acetilgalactosamina); Glucur = ácido glucurónico; Rham = ramnosa; Fuc = fucosa; Xyl = xilosa; Ara = arabinosa

Los hongos y bacterias son organismos saprófitos y los principales recicladores de la biomasa orgánica y elementos inorgánicos de la biósfera manteniendo continuos los ciclos biogeoquímicos de Carbono, Nitrógeno, Fósforo y Azufre. Un saprófito es un organismo heterótrofo y quimiorganotrofo que obtiene energía química y carbono de la degradación de moléculas orgánicas complejas preexistentes. La energía y fuentes de carbono requeridas son obtenidas por medio de procesos metabólicos multi-enzimáticos de polisacáridos, lípidos y proteínas insolubles^{39,40}. Las enzimas catalizan la despolimerización de macromoléculas y se pueden clasificar de acuerdo a su localización como intra y extra-celulares y respecto a su función como hidrolasas y oxidorreductasas. La secreción de un coctel de enzimas oxidativas actúa de forma cooperativa y sinérgica convirtiendo residuos orgánicos ricos en polímeros recalcitrantes e insolubles provenientes de organismos muertos en monómeros de fácil absorción y transporte^{21,41}. Específicamente, los hongos saprófitos degradadores de biomasa vegetal como materiales leñosos ricos en fuentes lignocelulósicas son los partícipes centrales en el ciclo del Carbono global por el secuestro de CO₂ y la mineralización de carbono^{40,42}.

La composición química de la biomasa vegetal es variable lo que permite disponer de estructuras flexibles como materiales herbáceos o estructuras más resistentes como de troncos y ramas de árboles⁴³. Los materiales lignocelulósicos suelen ser un sistema recalcitrante debido a la integración fuerte de tres constituyentes poliméricos de proporciones variables de: i) celulosa, ii) hemicelulosa (en conjunto se denomina holocelulosa) y, iii) lignina que sirven de soporte estructural y confieren resistencia a la pared celular de células vegetales⁴⁰. Los polímeros lignocelulósicos son ampliamente utilizados en una serie de procesos industriales como la producción de alimentos, papel/pulpa, textiles, biocombustibles, detergentes, compuestos poliméricos, etc. Sin embargo, la velocidad y grado de degradación de la lignocelulosa depende de enzimas ligninolíticas como herramientas biológicas^{43,44}.

La celulosa es una de las moléculas orgánicas más abundantes sobre la Tierra y constituye aproximadamente el 45% del peso seco de la madera. Es un homopolímero lineal de unidades D-glucopiranosas unido por enlaces β-1,4 glicosídicos. Cada cadena de celulosa está ligada a otras cadenas mediante enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals que aportan rigidez⁴⁵. De acuerdo al número de enlaces de hidrógeno, si son pocos la celulosa se considera amorfa; mientras que si

son abundantes generan diferentes formas cristalinas denominadas celulosa I, II, III y IV. La celulosa I se encuentra normalmente en la pared celular⁴⁶. Las hemicelulosas, al igual que la celulosa, se han perfilado como fuentes de carbohidratos. La hemicelulosa suele ser un polímero de menor masa molar que la celulosa y más fácilmente hidrolizable debido a su estructura predominantemente amorfa. Los polímeros de hemicelulosa forman una estructura polimérica compleja, ramificada y tienen una mayor diversidad estructural que consiste en la unión de diferentes unidades de azúcares que incluyen xilano, xiloglucano, manano, glucomanano, galactoglucomanano y calosa⁴⁷. Las ramificaciones están conformadas de D-xilosa, F-galactosa, L-arabinosa y ácido D-glucurónico.

La lignina, es el polímero aromático más abundante sobre la biósfera. Es un polímero ramificado, amorfo y heterogéneo constituido por unidades de fenilpropano (p-curamil, coniferil y alcohol sinapílico) unido por diferentes clases de enlaces^{39,48}. En el ámbito estructural, la lignina mantiene unida la celulosa y la hemicelulosa entre sí rellenando, pegando y reforzando toda la estructura. De esta manera, las fibrillas elementales de celulosa 3-5 nm de diámetro se unen para formar microfibrillas de hasta 20 nm de diámetro^{21,25}.

En los ecosistemas, son reconocidos tres grupos de hongos superiores descomponedores de biomasa vegetal lignocelulósica: i) los hongos saprófitos de podredumbre blanca, ii) parda y, iii) de pudrición blanda⁴⁹. Cada categoría se clasifica de acuerdo a la capacidad degradativa enzimática de biomasa lignocelulósica. Las interacciones de descomposición son asociadas a una variedad de enzimas extracelulares ligninolíticas que exponen los polisacáridos de la pared celular de células vegetales para su posterior digestión. El sistema multienzimático extracelular de los hongos saprófitos es producido en el retículo endoplasmático rugoso de las hifas^{39,50} y exudadas hacia el medio circundante a través de vesículas^{11,21}. De acuerdo a la composición química del material a degradar, el hongo desarrolla una estrategia encargada por un arsenal de enzimas hidrolíticas y oxidorreductasas⁵¹. Estas enzimas se conocen como enzimas activas en carbohidratos (CAZymes, por sus siglas en inglés Carbohydrate-Active enZymes) y se clasifican en numerosas familias de glucosido hidrolasas (GHs), glicosiltransferasas (GTs), polisacáridos liasas (PLs), carbohidratos esterasas (CEs) y actividades auxiliares (AAs), las últimas de las cuales incluyen enzimas oxidativas, como la celobiosa deshidrogenasa (CDH) capaz de degradar y modificar la celulosa,

hemicelulosa y lignina al producir radicales hidroxilo libres, y el polisacárido monooxigenasa lítica (LPMO)^{9,39}.

La degradación de la biomasa lignocelulósica se lleva a cabo por la mezcla de enzimas que agrupan las celulasas, hemicelulasas, pectinasas y enzimas oxidativas extracelulares que actúan de manera cooperativa y sinérgica. En la Tabla 2, se resume la actividad enzimática de algunos hongos de podredumbre blanca en sustratos de fermentación en estado sólido durante 14 días.

Las celulasas catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos β -1,4 que mantienen unidas las cadenas de celulosa y, según su actividad, se clasifican en endoglucanasas (EC 3.2.1.4), exoglucanasas (EC 3.2.1.74) y β -glucosidasas (EC 3.2.1.8)⁵¹. Las hemicelulasas son enzimas específicas que despolimerizan las hemicelulasas, entre las enzimas más estudiadas y abundantes destacan las xilanasas que catalizan la hidrólisis del esqueleto de xilano. Entre las xilanasas, las β -1,4-endoxilanasas (EC 3.2.1.8) hidrolizan enlaces β -1,4 que unen las xilasas, y las β -xilosidasas (EC 3.2.1.37) hidrolizan xilooligosacáridos formados por las endoxilanasas. Las ramificaciones presentes en el xilano son hidrolizadas por la catálisis de α -L-arabonofuranosidas, α -glucuronidasas, acetilxilano esterasas y feruloil esterasas. Las pectinasas son un complejo de enzimas que degradan la pectina, polisacáridos ramificados presentes en la pared celular vegetal. Su esqueleto principal es de ácido D-galacturónico y las cadenas laterales son generalmente de xilosa, galactosa o arabinosa. Mientras que, por su resistencia química y complejidad estructural, la despolimerización de la lignina es catalizada por enzimas inespecíficas extracelulares de alto poder oxidativo. Las mismas agrupan las enzimas lacasas (Lac) y enzimas peroxidadas como lignina peroxidasa (LiP; EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasa (MnP; EC 1.11.1.13) y enzimas híbridas conocidas como peroxidadas versátiles (VP EC

1.11.1.16), entre otras^{43,53-55}.

El grupo de hongos de pudrición blanca se destaca por su alta capacidad de degradación de lignina, así como también de polisacáridos de celulosa y hemicelulosa por poseer un sistema enzimático extracelular de degradación de lignina altamente activo^{53,54,56,57}. El potencial ligninolítico de hongos de pudrición blanca para degradar y digerir la pared celular vegetal lo ha convertido en uno de los principales microorganismos considerados para la obtención de biomateriales basados en micelio (Tablas 2 y 3). Al inocular el micelio de hongos de podredumbre blanca en sustratos orgánicos sólidos de naturaleza lignocelulósica, se obtiene un compuesto ligero que consiste en una red microscópica entrelazada tridimensionalmente de fibras de refuerzo naturales presentes en la materia prima y células miceliales filamentosas⁵⁸⁻⁶³. El material orgánico suele ser degradado y reemplazado por biomasa fúngica creando una capa esponjosa o compacta que entreteje al sustrato, moldeado o adherido a soportes naturales y sintéticos, tales como papel, yute, algodón fieltro, fibras de vidrio, metal y carbono en la obtención de productos para empaquetado y aislamiento, biotextiles, materiales para construcción para viviendas, entre otros usos^{44,46,62,63}. Es de esperarse que mientras mayor sea el potencial ligninolítico de las cepas fúngicas empleadas mayor sea su capacidad de colonizar el sustrato lignocelulósico empleado.

Biomateriales a base de micelio fúngico

Los nuevos vientos de cambio conllevan a replantear con premura arquetipos fósiles del pensamiento y patrones morales y bioéticos que contradicen el derecho a la vida. El despertar inminente de una nueva cultura material que integra los principios de la economía sostenible exige indudablemente estar al nivel de los nuevos desafíos tanto de rasgos bioéticos

Especie	Sustrato	Actividad enzimática U/mgP					Ref.
		MnP	LiP	Lacasa	Celulosa	Hemicelulosa	
<i>Ganoderma applanatum</i>	Paja de trigo	90.363	0.000	46.682	--	76.692*	52
<i>Trametes versicolor</i>	Paja de trigo	66.69	0.000	17.339	--	27.675*	52
	Aserrín y astillas de álamo	73 ± 7	0.33 ± 0.04	7.0 ± 0.5	1.15 ± 0.2	2.2 ± 0.2	44
<i>Ganoderma lucidum</i>	Aserrín y astillas de álamo	7.7 ± 0.6	1.50 ± 0.04	5.0 ± 0.8	0.75 ± 0.2	2.0 ± 0.2	44
<i>Polyporus fomentarius</i>	Aserrín y astillas de álamo	7.8 ± 0.8	0.46 ± 0.03	7.4 ± 0.9	1.25 ± 0.2	1.3 ± 0.2	44
<i>Perenniporia fraxinea</i>	Aserrín y astillas de álamo	13 ± 1	0.22 ± 0.022	2.2 ± 0.7	0.8 ± 0.3	1.8 ± 0.3	44

*Sólo Xilosa

Tabla 2. Actividad enzimática de hongos de podredumbre blanca desarrollados por fermentación en sustrato sólido durante 14 días.

como tecnológicos. Entre los últimos, se encuentra el hecho de reconocer el surgimiento espontáneo de la "Biotecnología Material" que, bajo un enfoque multi, inter y transdisciplinario, se concibe desde sus inicios con una clara cohesión "Sofista" del Arte y la Ciencia unidos. En este sentido, la Biotecnología Material pudiera definirse como "el uso racional de la biodiversidad para darle valor añadido a materiales naturales, compuestos o desechos orgánicos y convertirlos en productos biodegradables útiles para la sociedad, el arte y la cultura, en reemplazo de otros que pudieran ser perjudiciales para el ambiente o perniciosos para la vida, en sí mismos, o en su proceso de producción".

En principio, un biomaterial se puede definir como "un material funcional que ha sido diseñado y construido a partir de una materia prima biológica, tales como plantas, algas, bacterias, hongos, asociaciones simbióticas mutualistas de microorganismos o biopolímeros microbianos". Dichos biomateriales, vistos como producto final, pueden o no estar mezclados con materiales naturales, compuestos y/o desechos orgánicos. Son materiales autogenerados por algún tipo de organismo vivo y son basados en los nuevos paradigmas de la fabricación alternativa ya que parten de la lógica "de hacer crecer los nuevos materiales en lugar de extraerlos", integrando, de esta manera, los principios de la economía circular y de la Biotecnología Material, asegurando la susceptibilidad de los mismos a ser degradados y volver a su estado original en la naturaleza. Así mismo, se debe garantizar que los procesos productivos de los biomateriales, en todas sus escalas y en toda su cadena de valor, no deben comprometer o perjudicar al medio ambiente.

Según expresan lógicamente fundadores de Radial Biomateriales (@radial.bio), lo ideal sería comprender dos grandes clasificaciones de los biomateriales. Por un lado, i) los bio-basados, que son aquellos que tienen un porcentaje de composición biológica en su estructura y, por otro, ii) los bio-fabricados, que son aquellos que emplean un microorganismo vivo ya sea como materia prima o durante su proceso de fabricación. A pesar que el último tipo de biomaterial también pudiera ser reconocido como bio-basado, éste se distingue por "crecer, adherirse y moldearse a una superficie a expensas de algún tipo de organismo vivo". Finalmente, un biomaterial debe cumplir con ciertos criterios tales como poseer una densidad y peso adecuados, deben ser inertes, es necesario que disponga

de una resistencia mecánica apropiada, ser fácil de fabricar y de producirse a gran escala^{60,62}.

En el caso de los biomateriales a base de micelio fúngico, nos referimos a aquellos que son auto-generados por la estructura micelial de hongos, por lo tanto, se comprenden como bio-fabricados (Figura 3). Los sustratos lignocelulósicos son ideales para el desarrollo de biomateriales a base de micelio fúngico^{64,65}. Los materiales compuestos a base de micelio resultan del crecimiento micelial vegetativo y/o aéreo en materiales orgánicos como desechos agrícolas⁶⁶. Entre los sustratos más empleados resultan los residuos agroindustriales, forestales y la biomasa residual de bosques primarios y secundarios (Tabla 3).

El tipo de biomaterial a obtener subyace en la naturaleza y procesamiento del sustrato a emplear, los parámetros de crecimiento, los requerimientos nutricionales y las características genéticas del hongo a emplear. Estos parámetros, a pesar que en algunos trabajos de investigación no son detallados, son críticos en el nivel de colonización y el grosor del micelio para la determinación de la rigidez, flexibilidad, resistencia a la tracción, hidrofobicidad, entre otras⁶⁶.

El acondicionamiento físico del sustrato es clave en el rendimiento y de sus propiedades estructurales del desarrollo micelial del biomaterial que se espera obtener. Las condiciones físicas necesarias a controlar para los materiales a base de micelio son los niveles de O_2 , CO_2 , humedad relativa, exposición a la luz, flujo de aire y la temperatura. En función al desarrollo micelial, su clasificación se proyecta en materiales bio-fabricados a partir del micelio vegetativo o micelio aéreo, tal como se explica a continuación^{1,58}.

Biomateriales desarrollados a partir de corrientes lignocelulósicas y micelio vegetativo

En la literatura se reconocen dos categorías de diseño para los biomateriales obtenidos a partir del desarrollo micelial vegetativo sobre sustratos lignocelulósicos: i) tipo espuma y ii) tipo sándwich³⁶. Ambos biomateriales se muestran en la Figura 4.

Espumas a base de micelio o MBFs

Las espumas a base de micelio o MBFs (por sus siglas en inglés, mycelium-based foams) son biomateriales de baja



Figura 3. Materiales compuestos de micelio fúngico implementados en la industria.

Especie	Sustrato	Esterilización/ Pasteurización	Inoculación	Molde	Incubación	Secado	Producto	Ref.
<i>T. versicolor</i> / <i>P. ostreatus</i>	Cáñamo Viruta de madera	Hervir agua 100 °C o H ₂ O ₂ 0,3%	10-20 % de SFS (ceñeno)	Moldes plásticos	Oscuridad total 90-100 % HR. Temperatura ambiente 30 días	Horno 125 °C 2 horas	Espumas	69
<i>G. lucidum</i> / <i>P. ostreatus</i>	Celulosa Celulosa-PDB	Autoclave 120 °C x 15 min	Placas de Agar	N/A	25-30 °C 70-80 % HR 20 días	Horno 60 °C 2 horas	Capas fibrosas	70
<i>Ipex lacteus</i>	Aserrín de abedul ≤ 5 mm, grano de mijo salvado de trigo, fibras naturales y CaSO ₄	Pasteurización	Placas de agar	Moldes cilíndricos	14-42 días	Horno 60 °C 24 horas Antes de desmoldar	Espumas	100
<i>T. versicolor</i>	Lino Polvo de lino Fibras de lino tratadas Fibras de lino sin tratar Desechos de lino Polvo de paja de trigo Paja de trigo	Autoclave 121 °C 20 min	70% sustrato seco 20 % agua autoclavada desmineralizada 10 % SFS (mezcla de granos)	Moldes PVC	28 °C 8 días en el molde 8 días fuera del molde	70 °C 5-10 horas	Aislamiento térmico	68
<i>G. lucidum</i>	Regolita Granos de café Astillas de madera Mezcla de granos Cereal de quinua	Autoclave	Inóculo en PDYA	Bolsas plásticas y moldes	23-30 °C 14 días	Horno 120 °C	Arquitectura aeroespacial	101
<i>T. versicolor</i> / <i>Neurospora crassa</i>	Matriz de yute, PDB	Autoclave 30 min	Inóculo en PDA	Recipientes de plástico	25 °C Cada 2-3 días humedecer la matriz con PDB 30 días	Glicerina 1.5 h Recubrimiento de proteína de soja, agua destilada (10% p/p) y NaOH 2,5 M pH 10 Baño maría 80 °C 30 min Secar al ambiente 15 horas	Micotextiles	102
<i>P. ostreatus</i> / <i>T. multicolor</i>	Fibra de algodón no tejida (HR 55%) Aserrín de haya, paja de colza 1-3 cm y salvado (HR 65-70%)	Autoclave	SFS	Moldes de plástico (34x34x4 cm, PET-G). Lo moldes son cubiertos con láminas de celofán (0,35µm)	25 °C 14 días en el molde 10 días fuera del molde Oscuridad	Presión F=30 kN caliente 150 °C o frío 20°C 20 min *Los materiales expuestos a la presión en frío fueron secadas 24-48 h a temperatura ambiente	Espumas	77
—	Jute biotex Biotex flax Celulosa BioMid	Autoclave	Núcleo: SFS Kenaf y cáñamo (1:1) 120 g Láminas Dos capas de fibra natural por lado	Moldes de plástico (20,3x6,35 x2,54 cm)	Dentro de fundas de polipropileno 24 °C 5 días HR 98%	Horno 82 °C 12 horas Prensado térmico 250 °C 20 min Recubrimiento con resina	Estructuras tipo Sandwich	103
<i>Pycnoporus sanguineus</i> / <i>P. albidus</i> / <i>Lentinus velutinus</i>	Aserrín <i>Fibius sp.</i> 94% salvado de trigo molido 5% y 1% carbonato de calcio (CaCO ₃)	Autoclave 180 min 1 atm	SFS granos de trigo, 1% CaCO ₃ y 66% de humedad	Moldes de plástico 10x6 cm 5% SFS	24 ±2 °C	Horno 80 °C 24 horas	Espumas	104

Tabla 3. Publicaciones relacionadas a métodos de producción y procesamiento de materiales compuestos de micelio en el periodo 2015-2020.

*Modificado de Elsacker *et al.*, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138431>⁶⁷

densidad, porosos y altamente anisotrópicos, es decir, sus propiedades mecánicas son asimétricas en diferentes direcciones. A excepción de ladrillos y paneles de micelio, no necesitan de un prensado (calor o frío). Los principales sustratos mencionados en la literatura son fibras, cáscaras o pulpas de madera con partículas de 5-25 mm de diámetro. Su incubación se realiza en un microambiente relativamente húmedo 70-78%, temperatura 24-28 °C y sin necesidad de luz, riego o insumos químicos^{31,60,66}. Una vez que el micelio coloniza el sustrato es sometido a calor y prensado hasta un punto crítico para inactivar el micelio y reducir la humedad relativa hasta 10-15%, dando como resultado materiales con propiedades similares a las espumas de poliestireno expandido u otras espumas para embalaje, el aislamiento térmico o acústico y/o materiales de construcción^{67,68}. Appels *et al.*, 2019, presentó un diseño experimental con especies de *Pleurotus ostreatus* y *Trametes*

versicolor inoculados en sustratos de paja, aserrín y algodón obteniendo diferencias significativas en el rendimiento mecánico de materiales compuestos según el sustrato y el proceso de fabricación, específicamente el prensado. Los materiales a base de algodón fueron menos rígidos y más resistentes a la humedad que compuestos a base de paja. Mientras que, respecto al proceso de fabricación, el prensado con calor aumentó la densidad tres veces más ((0.35 - 0.39 g/cm³) que materiales sin prensado, mejorando la homogeneidad, la resistencia a la tracción (0.15 - 0.24 MPa) y la rigidez de los materiales indistintamente del sustrato y la cepa utilizada. Además, presentó una gran similitud con la densidad y módulo de elasticidad longitudinal o Módulo de Young (35 - 97 MPa) a espumas de poliestireno, corcho y madera ⁶⁶. Los biomateriales auto-generados por la cepa súper productora de la casa *Pycnoporus cinnabarinus* también presentaron una buena

elasticidad y capacidad de amortiguación adecuado como material de embalaje. Entre las ventajas de fabricación destacan su baja densidad, resistencia competitiva, propiedades mecánicas de tracción e impacto y estabilidad a altas temperaturas y a la radiación ultravioleta, volviéndolos competitivos entre materiales sintéticos (espumas de poliestireno), biológicos y nanoestructurados^{30,36,59,65}.

Compuestos tipo sándwich o MBSCs

Los compuestos tipo sándwich a base de micelio o MBSCs (por sus siglas en inglés mycelium-based sandwich composites) consisten generalmente de un núcleo de composición recubierto por dos o más capas secas, esterilizadas y pre impregnadas; compuestas de fibras lignocelulósicas o textiles naturales (lino, yute o celulosa) con la forma deseada del producto a obtener³⁶. Posteriormente, se inactiva el micelio por presando térmico y es curado con resina natural. El sistema de fabricación es detallado en siete pasos por Jiang *et al.* (2016)⁷⁰. La acción cohesiva natural del micelio actúa como un pegamento natural y auto ensamblable dando como resultado un solo bloque. El uso de láminas de lino reporta una colonización más eficiente y de mayor producción de biomasa. En general, los MBSCs presentan un factor adicional de heterogeneidad entre las capas laminadas y el núcleo que, desde un punto de vista mecánico, son estructuras más fuertes y rígidas mostrando un módulo de elasticidad y resistencia a la tracción mayores a los MBFs. Esta categoría de manufactura es empleada para la fabricación de biotextiles. En condiciones controladas, las propiedades físicas, mecánicas y termodinámicas, tales como la morfología, densidad, textura, apariencia, cinética de crecimiento, resistencia a la tracción y flexión, termogravimetría, absorción de agua y humedad son factores cualitativos y cuantitativos deben ser evaluados^{36,67,71-73}. Juntos, alcanzan diferencias significativas en el rendimiento y factibilidad de los biomateriales⁹.

Según Appels *et al.* 2019, el prensado con calor mejora la homogeneidad, la resistencia y rigidez (densidad y módulo de elasticidad) de los materiales cambiando su comportamiento similar a espumas, corchos o madera. En términos generales, demuestra que este tipo de modificaciones generan diferencias significativas en el rendimiento de los biomateriales. Específicamente, los materiales renovables basados en micelio desarrollados en paja son más rígidos y menos resistentes a la humedad que los compuestos a base de algodón⁷⁴. Actualmente, Ecovative Designs LLC fabrica una madera micelial denominada comercialmente MycoBoard™ que posee una densidad (0.685 g/cm³) mucha más baja que los paneles de vidrio y el poliéster (1.522 g/cm³). Los paneles de micelio son más fuertes, mecanizables, personalizables y resistentes al fuego Clase B¹⁰. Cabe destacar que la NASA (por sus siglas en inglés, National Aeronautics and Space Administration) tiene sus ojos puestos en la micotectura, proponiendo nuevos conceptos de diseño arquitectónico aeroespacial basados en compuestos de micelio fúngico vegetativo. La idea es utilizar los residuos orgánicos generados por la tripulación, agua, regolito (materiales rocosos sueltos y provenientes de la meteorización del suelo) y planchas de micelio inactivas para fabricar materiales fibrosos y ligeros autoajustable con buenas propiedades mecánicas. Entre sus usos, se ha considerado la fabricación de paneles, protección contra la radiación, sellos de vapor, armazón de vehículos y muebles, retardantes de fuego, entre otros. Así mismo, la NASA propone que los materiales fúngicos sean complementados con bacterias como *Bacillus subtilis* para generar una relación mutualista permitiendo la integridad estructural

mediante la mineralización, producción de polímeros y formación de filamentos. Por último, además de proponer acelerar el crecimiento mediante la secreción de metabolitos en el micelio, visualizan emplear a los hongos como biosensores para la detección de presión y fallas en la integridad estructural de las naves espaciales midiendo la tensión mecánica a través del cambio de color o fluorescencia⁷⁵.

Biomateriales desarrollados a partir de corrientes lignocelulósicas y micelio aéreo

Desde la época antes de Cristo (a. C.), específicamente entre los años 3350 y 3100 a.C. ya se registra el uso de piezas de cuerpo fructíferos de especies como *Piptoporus betulinus* y *Fomes fomentarius* como material de yesca y con fines espirituales⁷⁶. Al pasar los años, las aplicaciones con el cuerpo fructífero de algunos hongos como *F. fomentarius* han ido variando. Una de estas, es la elaboración de biotextiles siendo los principales productos obtenidos a partir de este cuero fúngico sombreros, cinturones, bolsos, cuadros, paño de limpieza para gafas, entre otros. Estos hongos son cosechados y cortados en franjas siguiendo el crecimiento radial del cuerpo fructífero y posteriormente almacenados en cajas de madera por 2 semanas para mantenerlos lisos antes de su uso⁷⁷. Los hongos en el aire desarrollan su cuerpo fructífero a partir del micelio aéreo para su reproducción y dispersión de esporas. Para ello, sus hifas contienen proteínas morfogénicas que responden al ambiente aéreo colonizando la superficie del sustrato creando una capa esponjosa o compacta. La capa de micelio también se conoce como "fungal skin"⁶⁶, considerada una alternativa al cuero animal por sus propiedades de maleabilidad, inducción de crecimiento aéreo homogéneo, sin procesos de curtido o reactivos contaminantes, y sobre todo es biodegradable y libres de la crueldad animal⁷⁸.

El interés comercial y científico en el micelio aéreo por producir materiales similares al cuero ha despertado el interés de varias empresas de base Biotecnológica en el mundo. MycoWorks Inc., Bolth Threads y Mycotech Lab son pioneros en la generación de alternativas para la industria textil, específicamente el cuero⁷⁹⁻⁸¹. En comparación a los textiles obtenidos de cueros de bovinos y sintéticos, el cuero micelial tiene la apariencia y propiedades similares⁸², inclusive, MycoWorks Inc. comenta que pueden lograr obtener cuero micelial con propiedades superiores al cuero animal. Para ello, la modulación de crecimiento de micelio aéreo con características estéticas y/o de un espesor de calidad se pueden lograr a partir del crecimiento vegetativo, la selección del organismo modulador y de su distribución homogénea sobre el sustrato⁸³. MycoWorks Inc. desarrolló un cuero de micelio fino comercializado como Reishi™ a partir de *Ganoderma lucidum* y algodón. En el camino de MycoWorks Inc. por la estandarización y optimización de las técnicas y procesos de producción, se propusieron estrategias para aumentar la resistencia y flexibilidad mediante la implementación de Cross-linkers para la formación de enlaces moleculares entre fibras de quitosano. Entre las propuestas de cross-linkers se mencionan a nanocompuestos de quitina y ácido subérico, o-quinona a través de la catálisis de sustratos fenólicos vía tirosinasa y genipina. Además, la aplicación de recubrimientos naturales que actúan como una barrera de humedad, como la aplicación de capas de zeína de maíz con PEG, han mostrado una resistencia a la tensión de 6 MPa e insolubilidad en agua⁷³. MycoWorks Inc. ha logrado obtener en sus materiales finos de micelio características superficiales aterciopeladas y esponjosas y, además, que se pueden cortar, procesar y mecanizar con más materiales para mejorar sus propiedades físicas y mecánicas.

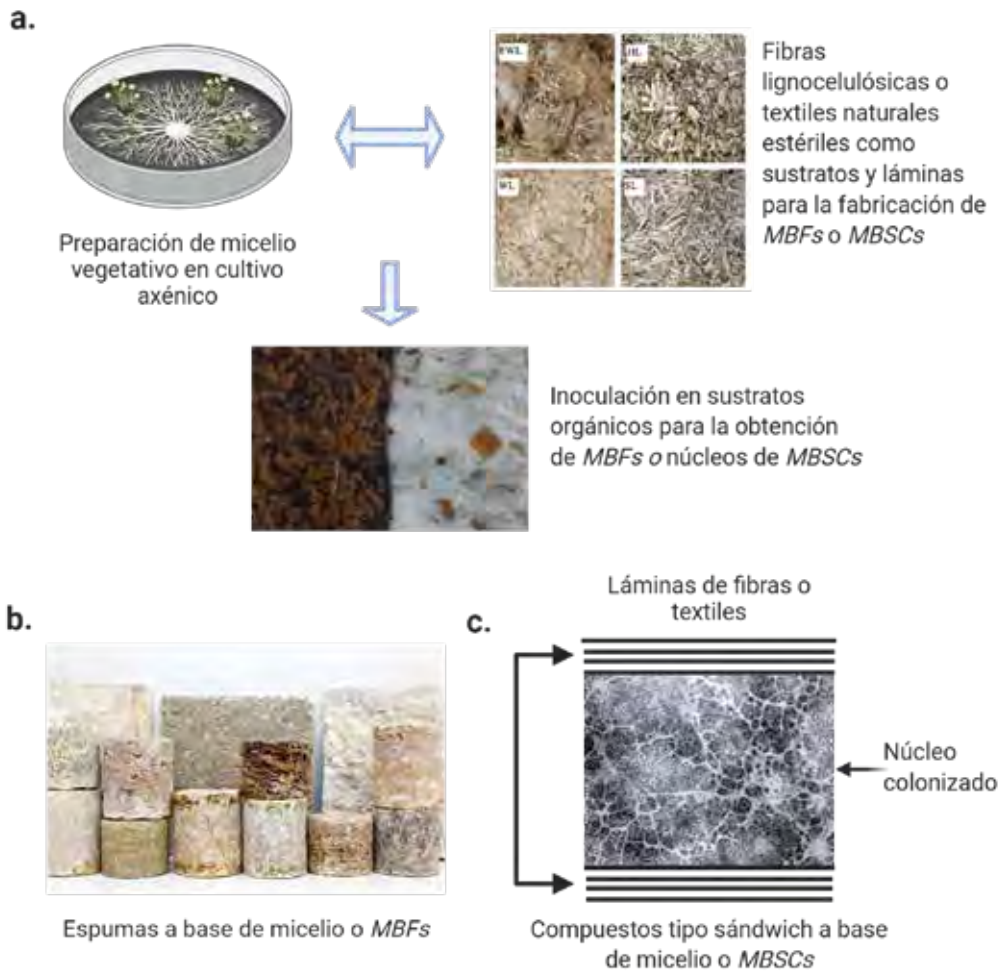


Figura 4. Biomateriales desarrollados a partir de corrientes lignocelulósicas y micelio vegetativo a. Preparación y elaboración de MBFs y núcleos para MBSCs⁶⁵. "Mycelium front" by harrington_alison is licensed under CC BY-SA 2.0. b. Productos diseñados a partir de MBFs para aislamiento y empaquetamiento. Obtenido de Building On Mycelium: <https://www.materialincubator.com/building-on-mycelium>. c. Diseño y fabricación de MBSCs. Una vez miceliado el núcleo se agregan capas de fibras vegetales o textiles para reforzar su resistencia. Modificado de: "Mycelium" by Bushman.K is licensed under CC BY-NC 2.0. Diagrama creado con BioRender.com.

Por otro lado, Mycotech ha lanzado al mercado una gama de productos que incluyen zapatos, carteras y correas de reloj fabricados con su sustituto del cuero derivado del micelio Mylea™. Su cuero biodegradable tiene dos presentaciones, uno de color marrón natural y cuero negro teñido naturalmente. Ambos presentan propiedades mecánicas similares; resistencia a la tracción 8 -11 MPa, Elongación 22-35 % y resistencia al desgarro 24 N⁶⁴. Mientras que, Bolt Threads, ofrece su producto de micelio llamado Mylo™ que consiste completamente en capas naturales de fibra de micelio adherida directamente y compactada creando una unión sólida y fuerte. A pesar de todo, la información disponible para la comunidad científica necesaria para la replicación de cuero micelial es aún limitada. El proyecto BioFab con un propósito mayor por la democratización del conocimiento sobre los biomateriales, divulgó la guía práctica para el desarrollo de textiles conformados por micelio y fibras naturales. El micotextil se elaboró a partir del desarrollo de micelio más o menos homogéneo de *Trametes versicolor* y *Neurospora crassa* sobre una matriz de fibra vegetal (yute) y sumergido en un medio de cultivo líquido PDB. Un punto a considerar es que el cultivo requiere el suministro del medio líquido cada 2-3 días para mantener el micelio humectado⁶⁵.

Muy recientemente, aparte de emplearse el micelio aéreo con fines biotextiles, también se utiliza como micoproteína,

una fuente de alimento nutritiva, de alto contenido en aminoácidos y fibra, así como de bajo contenido de grasas saturadas, colesterol, sodio y azúcar⁶⁶. Dichas propiedades, hacen del micelio aéreo un alimento saludable y de buena palatabilidad, de estructura y textura similar a la de la carne por su similitud al tamaño de la fibra. Entre los productos con oferta para el consumidor destaca Atlast™ desarrollado por Ecovative Design LLC., se basa en la premisa de que los hongos pueden cultivarse para imitar el tocino, los filetes, las pechugas de pollo y otros cortes enteros de origen animal. El micelio forma estructuras a nivel de micras con extrema precisión pareciéndose a la carne^{10,26,58}. Otra gama de productos reconocidos en 17 países del mundo son Quorn™. Su proceso de fabricación de micelio inicia en fermentadores de aire de 40 metros, alimentado continuamente con agua, sales y glucosa obtenida de la digestión enzimática de almidón de trigo o maíz⁶⁷. Una vez crecido el micelio, el caldo nutritivo es calentado y recolectado por centrifugación para obtener una pasta de micelio^{66,68}.

Propiedad intelectual, producción de biomateriales compuestos de micelio y empresas a nivel mundial

Las empresas pioneras en la producción masiva de materiales compuestos de micelio de hongos mantienen encriptados los detalles técnicos, así como la caracterización física

y mecánica de los biomateriales. En general, las tecnologías de producción de estos biomateriales son incipientes y aún en estado de desarrollo, siendo la primera referencia del año 2017. Hasta la fecha, se han registrado 48 patentes o solicitudes de patente en relación al uso de materiales fúngicos en diversas áreas¹. En la tabla 4, se presenta a las empresas del mundo que emplean micelio de hongos en productos de diseño comercial. La industria de la biofabricación de biomateriales de micelio de hongos está liderada por los siguientes actores: Ecovative Design LLC (USA) con el 45 % de todas las patentes seguido por Ford Global Tech (USA) con 19 %, Shenzhen Tech (China) con 17 %, MycoWorks Inc. (USA) con 6 % y Spora Biotech (Chile) con 0,48 %. Estas patentes se encuentran distribuidas principalmente en Estados Unidos (60 %) y China (30 %).

De los actores mencionados anteriormente, y en particular a los relacionados a la industria de los biotextiles, MycoWorks Inc. y Ecovative Design LLC, han propuesto y desarrollado un biomaterial denominado "cuero de hongos". MycoWorks Inc. fue la primera Start-Up en introducir este biomaterial textil en el 2017. Posteriormente, Ecovative Design LLC desarrolló su propio cuero de hongos y le vendieron la licencia a "Bolt Threads", una Start-Up ubicada en San Francisco, California (USA), que desarrolla textiles sustentables. Bolt Threads realizó un Kickstarter a finales del 2018 de una cartera hecha con su cuero de hongos que denominaron "Mylo", donde algunas de las carteras fueron entregadas a principios del 2020, y otras unidades aún continúan en producción. Hoy en día, Bolt Threads proyectó a "Mylo™" como su biomaterial textil con mayor escalamiento y anunciaron que su planta piloto tendrá una capacidad productiva de 1.000.000 pies cuadrados (ft²)/año, los cuales ellos mismos han indicado que ya están todos comprometidos⁹⁸.

Por otro lado, MycoWorks Inc., generó una nueva empresa para hacer el lanzamiento de su nuevo producto "Made with Reishi" con la cual hicieron un relanzamiento del material en la "New York Fashion Week 2020" (enero, 2020). Este material lo denominaron "Reishi™" y a la tecnología "Fine Mycelium". Posteriormente, cerraron una ronda de inversión por USD \$17.5 millones. La nueva financiación permitirá a MycoWorks Inc. continuar ampliando sus operaciones de fabricación para satisfacer la enorme demanda existente y cada vez más creciente en el mercado por su material Reishi™. Actualmente, la compañía opera dos instalaciones de producción y está a punto de abrir una tercera planta comercial con una capacidad de producción de 80.000 ft² de material por año para apoyar el lanzamiento de productos que han sido prototipados y probados con los principales clientes de lujo durante más de 18 meses. Otro actor, pero que no está registrado dentro del capital intelectual internacional, es Mycotech, están ubicados en Indonesia y su cuero de hongos lo denominaron Mylea™.

La nueva cultura micelial no solo ocurre en países potencia, sino también está sucediendo en Latinoamérica (Figura 5), donde Start-Ups emergen y empresas empiezan a consolidarse. Tal es el caso de Le Qara, una empresa peruana que produce un biotextil fabricado de asociaciones simbióticas de microorganismos y Spora Biotech en Chile (www.sporabiotech.com) que se consolida rápidamente en el desarrollo de cuero de micelio de hongos bajo la marca comercial Sporatex^{92,93}. Así mismo, Mycomaker de Ecuador, Hypha de Chile y Radial Biomaterials de México se enfocan en la generación de productos para el empaquetamiento, aislamiento, o kits de micotectura, asesoramiento para la fabricación de biomateriales a partir de micelio, así como a la promoción de programas educativos en la nueva cultura material^{90,95,96}.

Rol de los hongos en la economía circular

Los hongos son descomponedores por excelencia ya que utilizan su maquinaria enzimática para degradar desechos orgánicos convirtiéndolos en ácidos orgánicos, compuestos farmacéuticos, pigmentos, enzimas, productos alimenticios, biocombustibles, vitaminas, aminoácidos e incluso materiales para la construcción, empaquetamiento y cueros veganos^{3,4}.

Una bioeconomía tiene como objetivo reemplazar los recursos y procesos de origen fósil y perjudiciales con el medio ambiente por alternativas sostenibles que aprovechan la biomasa renovable para la generación de productos utilizados en la vida diaria¹. En este sentido, la nueva generación de biomateriales funcionales a base de micelio se encuentra alineada a los principios básicos de la economía circular ya que promueve que la producción agrícola y forestal sean más sostenibles y eficientes al emplear sus desechos orgánicos lignocelulósicos para la auto-generación de nuevos materiales útiles para la sociedad, la cultura y el arte⁵⁸. Además, los materiales a base de micelio se basan en compuestos poliméricos naturales (quitina, celulosa, proteínas, etc.) que requieren un mínimo de energía para su producción, ya que son auto-generados (auto-cultivo), y sus características se pueden ajustar modificando la composición de sus sustratos nutritivos. Posterior a su tiempo de vida útil, estos productos a base de micelio se convierten en fuente de alimento para compostaje y fertilizantes para las plantas, como sustrato para otros hongos, para pienso animal de alto valor nutricional o para la obtención de nuevos biomateriales de alto valor nano-biotecnológico con diversas aplicaciones en la industria. Esta gama de reutilización vuelve su producción más sostenible y eficiente⁷.

Conclusiones

Los hongos datan de aproximadamente 1200-1600 millones de años y evolucionaron a partir del súper grupo Opisthokonta por lo que son evolutivamente más cercanos a los animales que a las plantas. Pudiendo llegar a ser 5 millones de especies en el planeta, las cualidades excepcionales que poseen los hongos los han convertido en uno de los principales microorganismos considerados para la obtención de biomateriales bio-basados en micelio. Entre ellos, sus diversos ciclos de vida, su capacidad de sobrevivir a ambientes extremos, de nutrirse de polímeros lignocelulósicos complejos, su capacidad de reproducirse sexual o asexualmente, su poderosa maquinaria multienzimática extracelular para degradar y digerir la pared celular de las plantas, y la composición e integridad de su pared celular rica en quitina, glucanos y glicoproteínas, entre otros.

El micelio, como epicentro y origen de la nueva cultura micelial que se ramifica cada vez más colonizando espacios insospechados a nivel global, posee una gran resistencia mecánica, plasticidad e hidrofobicidad atribuidas a su pared celular. Siendo una red microscópica de filamentos tubulares fibrosos y alargados, interconectados entre sí y de crecimiento apical, el micelio funciona como una armadura del organismo ya que se encarga de conectar y trasladar ligeramente agua, azúcares y minerales formando un sistema cerrado en respuesta a estímulos o cambios en la composición del medio externo.

Partiendo de la lógica de hacer crecer los nuevos materiales en lugar de extraerlos, los biomateriales auto-generados por el micelio de hongos a partir de residuos poseen diferentes aplicaciones industriales, que van desde los materiales y productos para el empaquetamiento y aislamiento, los biotextiles, nuevas fuentes alimentarias basadas en el micelio, el arte y

Empresa	Ubicación	Especificaciones del material	Ref.
ALIMENTARIA			
Ecovative Design LLC	New Jersey, Estados Unidos	➤ Micelio comestible vegano de alto contenido en aminoácidos esenciales y nutrientes; mimetizando la forma y textura de tocino Atlas™	10
AISLAMIENTO Y EMPAQUETAMIENTO			
Ecovative Design LLC	New Jersey, Estados Unidos	➤ Espumas para empaquetamiento MycoComposite™ ➤ Espumas de micelio puro Mycoflex™ para la fabricación de chaquetas aislantes, forros térmicos, calzado y más.	10
Mogu	Inarzo, Italia	➤ Paneles modulares acústicos Mogu™	88
Ford Global Technologies LLC	Michigan, Estados Unidos	➤ Piezas moldeadas de espuma de micelio para el equipamiento de interiores de vehículos.	89
Radial Biomateriales	Jalisco, México	➤ Materiales diseñados a la medida para paquetería y embalaje	90
Loop Biotech	JD Delft, Países Bajos	➤ Ataúdes Loop Cocoon™ . Sus paredes son fabricadas de micelio y residuos orgánicos, mientras que en su interior contiene musgo	91
BIOTEXTILES			
MycoWorks Inc.	California, Estados Unidos	➤ Sustitutos de cuero fino a base de micelio Reishi™	78
Bolt Threads	California, Estados Unidos	➤ Alternativa sostenible al cuero animal Mylo™	79
Mycotech Lab	Bandung, Indonesia	➤ Cuero de micelio Mylea™	80
Le Qara	Perú	➤ Cuero microbiano biodegradable Le Qara	92
Spora Biotech	Chile	➤ Cuero de micelio sustentable Sporatex™	93
Mycel Project	República de Korea	➤ En colaboración con la industria Hyundai Motor, desarrollo de materiales de micelio que reemplazan el cuero y el de películas	94

Tabla 4. Empresas que emplean micelio de hongos en productos de diseño comercial.

ARQUITECTURA Y ARTE			
Ecovative Design LLC	New Jersey, Estados Unidos	➤ Paneles de construcción MycoBoard™ para diseños arquitectónicos ➤ Kits y manual para la producción de biomateriales a base de micelio	10
Mycomaker	Quito, Ecuador	➤ Kits de micotectura, asesoría para la producción de biomateriales a base de micelio, programas educativos de nueva cultura material	95
Radial Biomateriales	Jalisco, México	➤ Productos de diseño industrial o interiorismo	90
Mycel Project	República de Corea	➤ Diseño y producción de materiales (ej. lámparas) y módulos (ej. decoración) para interiores	94
Hypha	Chile	➤ Prototipado de formulados orgánicos y aislamiento de microorganismos	96

Tabla 4. Empresas que emplean micelio de hongos en productos de diseño comercial.



Figura 5. Industrias y laboratorios en el mundo que emplean el micelio de hongos en la manufactura alimentaria, biotextiles, aislamiento y empaquetamiento, arte y arquitectura. Diagrama creado con BioRender.com

el diseño arquitectónico, entre otras. La auto-generación de dichos biomateriales inicia al inocular el micelio de hongos de podredumbre blanca en sustratos orgánicos sólidos de naturaleza lignocelulósica. Al transcurrir el tiempo, y bajo condiciones controladas de crecimiento, el material orgánico suele ser degradado y reemplazado por la biomasa fúngica creando una capa esponjosa o compacta que entreteje al sustrato, moldeado o adherido a soportes naturales y sintéticos. Al final, se obtiene un compuesto ligero que consiste en una red entrela-

zada tridimensionalmente de fibras de naturales presentes en la materia prima y células miceliales filamentosas que, como un pegamento natural, le otorgan una alta resistencia mecánica y flexibilidad estructural.

Los biomateriales basados en micelio de hongos representan una alternativa sostenible, de bajo costo y nulo impacto ambiental, en los que su proceso de fabricación rompe los paradigmas del concepto clásico de "la materia". Sin embargo, el desarrollo de las tecnologías orientadas a la producción de

estos biomateriales compuestos de micelio de hongos aún es incipiente y los que existen se mantienen encriptados.

El despertar inminente de una nueva conciencia material que integra los principios de la economía sostenible exige indudablemente estar al nivel de los nuevos desafíos, tanto bioéticos como tecnológicos, sobre todo en Latinoamérica, donde han esporulado y extendido una gran cantidad de proyectos y emprendimientos basados en el crecimiento de nuevos biomateriales a partir de micelio de hongos.

Agradecimientos

Agradecemos a Spora Biotech por el apoyo irrestricto y financiamiento en el desarrollo de las Tesis de Grado de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad Regional Amazónica Ikiam tituladas: "Biodiversidad y caracterización de biomateriales promisorios a partir del micelio de hongos Polyporales aislados de un bosque piemontano amazónico (Napo, Ecuador)", desarrollada por KF, y "Estandarización de técnicas para el desarrollo de micelio aéreo de *Ganoderma lucidum* con fines de producción de micotextiles", desarrollada por SB.

Referencias bibliográficas

1. Cerimi, K., Akkaya, K. C., Pohl, C., Schmidt, B. & Neubauer, P. Fungi as source for new bio-based materials: A patent review. *Fungal Biol. Biotechnol.* 6, 1–10 (2019).
2. Appels, F. V. W. et al. Fabrication factors in influencing mechanical, moisture and water-related properties of mycelium-based composites. *Mater. Des.* 161, 64–71 (2019).
3. Meyer, V. et al. Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. *Fungal Biol. Biotechnol.* 7:5, 1–23 (2020).
4. Astudillo-Echeverría, A., Pazmiño-Centeno, D. & Naranjo-Briceño, L. Uso de CRISPR/Cas9 como herramienta de edición de genomas en hongos filamentosos: una revisión del estado actual y últimas tendencias. *Genética médica y genómica O*, (2020).
5. Jones, M., Mautner, A., Luenco, S., Bismarck, A. & John, S. Engineered mycelium composite construction materials from fungal biorefineries: A critical review. *Mater. Des.* 187, 108397 (2020).
6. Elsacker, E., Vandeloock, S., Brancart, J., Peeters, E. & De Laet, L. Mechanical, physical and chemical characterisation of mycelium-based composites with different types of lignocellulosic substrates. *PLoS One* 14, 1–20 (2019).
7. Stahel, W. R. The circular economy. *Nature* 531, 435–438 (2016).
8. Fletcher, I., Freer, A., Ahmed, A. & Fitzgerald, P. Effect of Temperature and Growth Media on Mycelium Growth of *Pleurotus Ostreatus* and *Ganoderma Lucidum* Strains. *Cohesive J. Microbiol. Infect. Dis.* 2, (2019).
9. Jones, M., Huynh, T., Dekiwadia, C., Daver, F. & John, S. Mycelium composites: A review of engineering characteristics and growth kinetics. *J. Bionanoscience* 11, 241–257 (2017).
10. Ecovative. We Grow Materials. Ecovative Design LLC <https://ecovatedesign.com/> (2020).
11. Kavanagh, K. *Fungi: Biology and applications*. (Wiley Blackwell, 2017).
12. Torruella, G. et al. Phylogenomics Reveals Convergent Evolution of Lifestyles in Close Relatives of Animals and Fungi. *Curr. Biol.* 25, 2404–2410 (2015).
13. Watkinson, S., Boddy, L. & Money, N. *The fungi*. Elsevier (Elsevier Ltd., 2016). doi:10.1016/b978-0-323-04475-2.50007-8.
14. Honegger, R., Edwards, D., Axe, L. & Strullu-Derrien, C. Fertile Protaxites taiti: A basal ascomycete with inoperculate, polysporous asci lacking croziers. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 373, (2018).
15. Watkinson, S., Boddy, L. & Money, N. *The Fungi*. Academic Press (2016). doi:10.2307/2421601.
16. Hawksworth, D. L. & Lücking, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol. Spectr.* 5, 79–95 (2017).
17. Willis, K. J. State of the World's Fungi. (2018).
18. Smith, M., Bruhn, J. & Anderson, J. The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. *Lett. to Nat.* 356, 428–431 (1992).
19. Hibbett, D. et al. Phylogenetic taxon definitions for Fungi, Dikarya, Ascomycota and Basidiomycota. *Int. Mycol. Assoc.* 9, 291–298 (2018).
20. Voisey, C. R. Intercalary growth in hyphae of filamentous fungi. *Fungal Biol. Rev.* 24, 123–131 (2010).
21. Jennings, D. *The physiology of fungal nutrition*. (Cambridge University Press, 1995).
22. Heaton, L. et al. Analysis of fungal networks. *Fungal Biol. Rev.* 26, 12–29 (2012).
23. Kuës, U. & Liu, Y. Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 141–152 (2000).
24. Hyde, K. D. et al. Fungal diversity notes 603–708: taxonomic and phylogenetic notes on genera and species. *Fungal Divers.* 87, 1–235 (2017).
25. Bennett, J. W., Lemke, P. A. & Howard, D. H. *The Fungal Community Its Organization and Role in the Ecosystem*. (2017).
26. Talbot, N. J. *Fungal biology: Growing into the air*. *Curr. Biol.* 7, 78–81 (1997).
27. Robledo, G. *Manual para el estudio de taxonomía, diversidad y ecología de Políporos*.
28. Gottlieb, D. *The Physiology of spore germination in fungi*. *Bot. Rev.* 16, 229–257 (1950).
29. Lew, R. R. Mass flow and pressure-driven hyphal extension in *Neurospora crassa*. *Microbiology* 151, 2685–2692 (2005).
30. Haneef, M. et al. Advanced Materials from Fungal Mycelium: Fabrication and Tuning of Physical Properties. *Sci. Rep.* 7, 1–11 (2017).
31. Winiski, J. Method for stimulating the expression of specific tissue morphologies in filamentous fungi. (2018).
32. Ruiz-Herrera, J. *Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly*. *Mycology Series xv*, 183 p. (2012).
33. Bartnicki-Garcia, S. Cell wall Chemistry, Morphogenesis, and Taxonomy of Fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22, 87–108 (1968).
34. Bartnicki-Garcia, S. Cell wall chemistry, morphogenesis, and Taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Furth.* 88–105 (1968).
35. Bowman, S. M. & Free, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Wiley Intersci.* 28, 799–808 (2006).
36. Girometta, C. et al. Physico-mechanical and thermodynamic properties of mycelium-based biocomposites: A review. *Sustain.* 11, (2019).
37. Ruiz-Herrera, J. & Ortiz-Castellanos, L. Cell wall glucans of fungi. A review. *Cell Surf.* 5, 100022 (2019).
38. Cassone, A. Development of vaccines for *Candida albicans*: Fighting a skilled transformer. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 884–891 (2013).
39. Zhao, Z., Liu, H., Wang, C. & Xu, J. R. Correction to Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi [BMC Genomics 14(2013) 274]. *BMC Genomics* 15, (2014).
40. Várnai, A. et al. Carbohydrate-Binding Modules of Fungal Cellulases. Occurrence in Nature, Function, and Relevance in Industrial Biomass Conversion. *Advances in Applied Microbiology* vol. 88 103–165 (2014).
41. Tchotot Tchoumi, J. M., Coetzee, M. P. A., Rajchenberg, M. & Roux, J. Taxonomy and species diversity of *Ganoderma* species in the Garden Route National Park of South Africa inferred from morphology and multilocus phylogenies. *Mycologia* 111, 730–747 (2019).
42. John, D. *Fungi in Ecosystem Processes*. *Fungi Ecosyst. Process.* Second Ed. 31, i–xxvi (2016).
43. Dashtban, M., Schraft, H. & Qin, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *Int. J. Biol. Sci.* 5, 578–595 (2009).
44. Doria, E. et al. International Biodeterioration & Biodegradation Evaluation of lignocellulolytic activities of ten fungal species able to degrade poplar wood. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 94, 160–166 (2014).
45. Pretratamientos De La Celulosa Y Biomasa Para La Sacarificación. *Sci. Tech.* XV, 284–289 (2009).

46. Baldrian, P. & Val, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *Fed. Eur. Microbiol. Soc.* 32, 501–521 (2008).
47. M., D., H., S. & W., Q. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *Int. J. Biol. Sci.* 5, 578 (2009).
48. Thakur, V. K., Thakur, M. K., Raghavan, P. & Kessler, M. R. Progress in Green Polymer Composites from Lignin for Multifunctional Applications: A Review. *Sustainable Chem. Eng.* 2, 1072–1092 (2014).
49. Álvarez, C., Reyes-Sosa, F. M. & Díez, B. Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. *Microb. Biotechnol.* 9, 149–156 (2016).
50. Montoya, S., Sanchez, O. & Levin, L. Pudrición Blanca Evaluation of Endoglucanase, Exoglucanase, Laccase, and Lignin Peroxidase Activities on Ten White-Rot Fungi. *Avaliação De Atividades. Biotechnol. en el Sect. Agropecu. y Agroind.* 12, 115–124 (2014).
51. Lechner, B. E. & Papinutti, V. L. Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw. *Process Biochem.* 41, 594–598 (2006).
52. Dinis, M. J. et al. Bioresource Technology Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. *Bioresour. Technol.* 100, 4829–4835 (2009).
53. Naranjo-briceño, L. et al. Potential Role of Extremophilic Hydrocarbonoclastic Fungi for Extra Heavy Crude Oil Bioconversion and the Sustainable Development of the Petroleum Industry. *Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance* (Springer Nature Publishers, 2019). doi:10.1007/978-3-030-19030-9.
54. Naranjo-Briceño, L. et al. Potential role of oxidative exoenzymes of the extremophilic fungus *Pestalotiopsis palmarum* BM-04 in biotransformation of extra-heavy crude oil. *Microb. Biotechnol.* 6, 720–730 (2013).
55. Naranjo Briceño, L., Urbina, H., De Sisto, A. & Leon, V. Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil. *Biocatal. Biotransformation* 25, 341–349 (2007).
56. Nguyen, K. A., Wikee, S. & Lumyong, S. Brief review: Lignocellulosic enzymes from polypores for efficient utilization of biomass. *Mycosphere* 9, 1073–1088 (2018).
57. Naranjo, L., Urbina, H., De Sisto, A. & Leon, V. Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil. *Biocatal. Biotransformation* 25, 341–349 (2007).
58. Grimm, D. & Wösten, A. B. Mushroom cultivation in the circular economy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 7795–7803 (2018) doi:https://doi.org/10.1007/s00253-018-9226-8.
59. Peter, M., Winiski, J. & O'Brien, M. Process and apparatus for producing mycelium biomaterial. (2019).
60. McIntyre, G., Eben, B. & Palazzolo, A. Mycological biomaterial. vol. 1 (2018).
61. Holt, G. A. et al. Fungal mycelium and cotton plant materials in the manufacture of biodegradable molded packaging material: Evaluation study of select blends of cotton byproducts. *J. Biobased Mater. Bioenergy* 6, 431–439 (2012).
62. Zeller, P. & Zocher, D. Ecovative's Breakthrough Biomaterials. *Fungal Mag.* 5(1), 51–56 (2012).
63. Leonowicz, A. et al. Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi. *Fungal Genet. Biol.* 27, 175–185 (1999).
64. Montoya, S., Sánchez, Ó. & Levin, L. Evaluación de actividades endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignina peroxidasa en diez hongos de pudrición blanca. *Biotechnol. en el Sect. Agropecu. y Agroindustrial* 12, 115–124 (2014).
65. Elsacker, E., Vandeloek, S., Brancart, J., Peeters, E. & Laet, L. De. Mechanical, physical and chemical characterisation of mycelium-based composites with different types of lignocellulosic substrates. *PLoS One* 1–20 (2019) doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213954.
66. Appels, F. V. W. et al. Fabrication factors influencing mechanical, moisture- and water-related properties of mycelium-based composites. *Mater. Des.* 161, 64–71 (2019).
67. Elsacker, E., Vandeloek, S., Van Wylick, A., Ruytinx, J., De Laet, L., & Peeters, E. (2020). A comprehensive framework for the production of mycelium-based lignocellulosic composites. *Science of the Total Environment*, 725, 138431. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138431>
68. Ross, P., Nicholas, W. & Caitlin, M. Method of producing fungal materials and objects made therefrom. vol. 1 40 (2018).
69. Stamets, P. E. Living systems from cardboard packaging materials. vol. 1 (2008).
70. Jiang, L., Walczyk, D., McIntyre, G. & Kin, W. Cost modeling and optimization of a manufacturing system for mycelium-based bio-composite parts. *J. Manuf. Syst.* 41, 8–20 (2016).
71. Lukacs, M. & Bhadra, D. Greener Solutions: Improvements of mycelium-based leather. *Final Rep. to Mycoworks* 54 (2017) doi:10.1002/ejoc.201200111.
72. Benson, K. F. et al. The mycelium of the *Trametes versicolor* (Turkey tail) mushroom and its fermented substrate each show potent and complementary immune activating properties in vitro. *BMC Complement. Altern. Med.* 19, 1–14 (2019).
73. Deeg, K., Gima, Z., Smith, A., Stoica, O. & Tran, K. Greener Solutions: Improving performance of mycelium-based leather. *Final Report to MycoWorks.* (2017).
74. Appels, F. et al. Fabrication factors in influencing mechanical, moisture and water-related properties of mycelium-based composites. *Mater. Des.* 161, 64–71 (2019).
75. Rothschild, L. J. et al. Myco-architecture off planet: growing surface structures at destination NIAC 2018 Phase I Final Report. 1–58 (2019).
76. Peintner, U., Pöder, R. & Pümpel, T. The Iceman's fungi. *Mycol. Res.* 102, 1153–1162 (1998).
77. Papp, N., Rudolf, K., Bencsik, T. & Czégényi, D. Ethnomycological use of *Fomes fomentarius* (L.) Fr. and *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst. in Transylvania, Romania. *Genet. Resour. Crop Evol.* 64, 101–111 (2017).
78. Jones, M., Gandia, A., John, S. & Bismarck, A. Leather-like material biofabrication using fungi. *Nature Sustainability* (2020) doi:10.1038/s41893-020-00606-1.
79. Mycoworks. Home - MycoWorks. Made with Reishi Fine mycelium <https://www.mycoworks.com/> (2020).
80. Bolt-Threads. Mylo Unleather. Mylo <https://www.mylo-unleather.com/> (2020).
81. MYCL. Mycotech Lab - Mycotech. Mylea <https://mycl.bio/> (2020).
82. Kaplan-Bie, J. Solution Based Post - Processing Methods For Mycological Biopolymer Material And Mycological Product Made Thereby. vol. 1 1–10 (2018).
83. Chase, J., Wenner, N., Ross, P. & Todd, M. deacetylation and crosslinking of chitin and chitosan in fungal materials and their composites for tunable properties. (2019).
84. Mylea. Technical data sheet Mylea™, The Mycelium Leather. (2019).
85. Dinis, M. J. et al. Bioresource Technology Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. *Bioresour. Technol.* 100, 4829–4835 (2009).
86. Finnigan, T. J. A. et al. Mycoprotein: The Future of Nutritious Non-meat Protein, a Symposium Review. in *Current Developments in Nutrition* vol. 3 (2019).
87. Cerimi, K., Akkaya, K. C., Pohl, C., Schmidt, B. & Neubauer, P. Fungi as source for new bio-based materials: A patent review. *Fungal Biol. Biotechnol.* 6, 1–10 (2019).
88. Nutrition, Q. What is Quorn's unique ingredient, mycoprotein, made of?
89. Mogu. Mogu Radical by Nature. Mogu acoustics <https://mogu.bio/> (2020).
90. Kalisz, R. E. & Rocco, C. A. Foamend Mycelium Structure and Method. vol. 1 1–32 (2011).
91. Radial. RADIAL – BIOMATERIALES. Tecnología <https://radialbio.com/> (2020).
92. Loop_Biotech. Loop Cocoon. World's first living coffin <https://www.loop-of-life.com/product> (2020).
93. Le Qara. Made by Le Qara Microorganisms <https://leqara.com/> (2020).
94. Sporatex, un biotextil creado a base de micelio de hongos. www.sporabiotech.com (2021).
95. Mycel Project - FROMHENCE DESIGN. Mycel Project <http://from->

hence.design/portfolio/mycel-project/ (2019).

96. Mycomaker. Somos - Mycomaker. Servicios <https://mycomaker.club/servicios/> (2020).
97. HYPHA. Lo que hacemos <https://hypha.cl/lo-que-hacemos/#serviciosdis> (2020).
98. Business of Fashion. Are The Best Days of Our Planet Ahead of Us? | Dan Widmaier | #BoFVOICES 2019. (2019).
99. Letivelt, R., Lindner, G., Teuffel, P. & Lamers, H. The production process and compressive strength of Mycelium-based materials. First Int. Conf. Bio-based Build. Mater. 1–6 (2020).
100. Yang, Z., Zhang, F., Still, B., White, M. & Amstislavski, P. Physical and Mechanical Properties of Fungal Mycelium-Based Biofoam. J. Mater. Civ. Engineering (2017) doi:10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0001866.
101. Rothschild, L. J. et al. Myco-architecture off planet: growing surface structures at destination NIAC 2018 Phase I Final Report. (2018) doi:Call: NNH17ZOA001N-18NIAC_A1.
102. Rodríguez, S. & De Pablo, C. Micotextil - Textiles de Hongos y Equipo Científico de Libre Acceso. 1–66 (2020).
103. Jiang, L., Walczyk, D., McIntyre, G. & Bucinell, R. A New Approach to Manufacturing Biocomposite Sandwich Structures: Mycelium-Based Cores. Int. Manuf. Science Eng. Conf. 1–11 (2016) doi:10.1115/msec2016-8864.
104. Bruscato, C., Malvessi, E. & Brandalise, R. High performance of macrofungi in the production of mycelium-based biofoams using sawdust - Sustainable technology for waste reduction. J. Clean. Prod. 234, 225–232 (2019).

Received: 20 noviembre 2020

Accepted: 15 enero 2021

REVIEW / ARTÍCULO DE REVISIÓN

Potential bioactive compounds of medicinal plants against new Coronavirus (SARS-CoV-2): A review

Patricia Isabel Manzano - Santana^{1,2,3}, Juan Pablo Peñarreta Tivillin¹, Iván Andrés Chóez-Guaranda¹, Ana Délida Barragán Lucas¹, Andrea Katherine Orellana - Manzano^{2,4}, Luca Rastrelli⁵

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.30

Abstract: Nowadays, COVID-19 cases are growing worldwide, and there is no evidence of an effective drug to combat the new SARS-CoV-2 virus. In this sense, medicinal plants as an alternative treatment are being used without control to handle the pandemic situation. Therefore, bioactive compounds against Coronavirus of medicinal plant species that grow in Ecuador are discussed. The plant species described in this review are *Azadirachta indica*, *Cinchona pubescens*, *Coriandrum sativum*, *Cúrcuma longa*, *Eucalyptus spp.*, *Morus alba*, and *Salvia rosmarinus*[A3]; and compounds are curcumin, coriandrin, deoxyojirimycin, kuwanon G, mulberroside A, oleanolic acid, rosmarinic acid, ursolic acid, quinine, eucalyptol, and jensenone.

Key words: Bioactivity, Coronavirus, COVID-19, medicinal plants, SARS-CoV-2.

1653

Introduction

SARS-CoV-2, the virus that causes coronavirus disease 2019 (COVID-19), is a new type of Coronavirus that currently has claimed 5,682,389 of infected people and 354,944 deaths globally. In Ecuador, the facts are also alarming, with 38,103 confirmed cases and 3,275 deaths¹.

The development of treatments to combat this terrible global pandemic is still under study by the scientific community because therapeutic options are not effective². Different combinations of medicines are being assessed without considering possible adverse effects and interactions due to health emergencies.

In contrast, in some megadiverse countries as Ecuador, the population targets the use of medicinal plants as an alternative treatment due to about 3000 medicinal plant species that are not being used properly³. Thus, this work describes a list of different compounds belonging to medicinal plant species that grow in Ecuador with potential bioactivity against new SARS-CoV-2.

Background

Medicinal plants species

Cúrcuma longa[A5] L.

Turmeric, possibly originating from India and belonging to the Zingiberaceae family [A6], is an evergreen herbaceous plant that grows mainly in India and China. The plant is distributed throughout the tropics and subtropical regions of the world⁴. The presence of various metabolites such as curcuminoids, oil content, flavonoids, phenolics, amino acids, proteins, and alkaloids reveals a correlation with their medicinal uses. Curcumin has been classified as Generally recognized as safe (GRAS) by the United States Food and Drug Administration (FDA), which means that the addition in food is considered safe⁵. Curcumin has been shown to have antiviral activity; it has acted as an efficient inhibitor of Epstein-Barr virus (EBV [A7] [A8] [A9] [A10]⁶⁻¹¹ and Human Immunodeficiency Virus (HIV). Also, it has inhibited the HIV-1 integrase necessary for viral replication⁴.

Moreover, this compound has been studied as an antiviral

agent against HIV, herpes simplex virus (HSV), hepatitis viruses, influenza type A virus (IAV [A11])¹², and Ebola virus¹³. The potential activity of curcumin against SARS-CoV-2 has been demonstrated by (14), using the molecular docking method to determine the affinity of binding between the active molecule and COVID-19 proteases [A12]^{15,16}. 6LU7 AND 6Y2E expressed in kcal/mol obtain favorable results and recommend the plant species for future studies [A13]¹⁷⁻¹⁹. Due to its various properties, curcumin has the potential for the development of new drugs⁴.

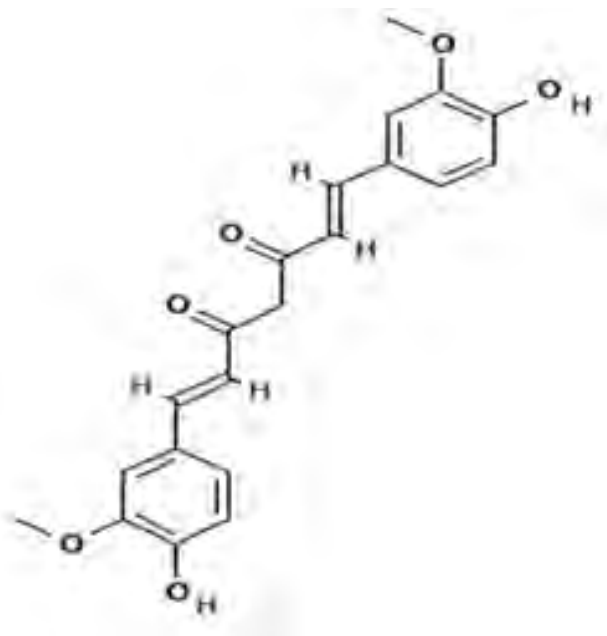


Figure 1. Curcumin: C₂₁H₂₀O₆.

¹ Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Guayaquil, Ecuador.

² Laboratorio para investigaciones biomédicas, Facultad de Ciencias de la Vida, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Guayaquil, Ecuador.

³ Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Guayaquil, Ecuador.

⁴ Universidad de Especialidades Espíritu Santo, Escuela de Odontología, Samborondón, Guayas, Ecuador.

⁵ Departamento de Ciencias Biomédicas y Farmacéuticas, Universidad de Salerno, Italia.

Coriandrum sativum[A14] L.

It belongs to a large family [A15] (apiaceae) of flowering plants, which belong to 455 genera distributed mostly in temperate zones, known as "Cilantro[A16]"²⁰. It is an annual plant native to the Mediterranean and the Middle East Regions²¹. A study assessed with hexane and aqueous extracts of the seed has revealed inhibition of 99 and 95% of Herpes Simplex with at a concentration of 500 ug / mL, demonstrating antiviral properties²¹. The potential activity against SARS-Cov-2 of the Coriandrin[A17]^{22,23}, a component of *C. sativum* has been demonstrated by molecular docking, using the COVID-19 6LU7 and 6Y2E proteases of the Coronavirus as binding targets obtaining optimal results¹⁴. SARS-CoV and SARS-CoV-2 are comparable at their receptors, such as the receptor-binding domain (RBD) and the receptor-binding motif (RBM) in the viral genome[A18]²⁴⁻²⁶. Consequently, Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) gets connected to RBM of the S protein when SARS affects^{27,28}. Extracts of *Coriandrum sativum* leaves have been reported to have different flavonoids, inhibit an angiotensin-converting enzyme activity, and prevent various cardiovascular disorders²⁹.

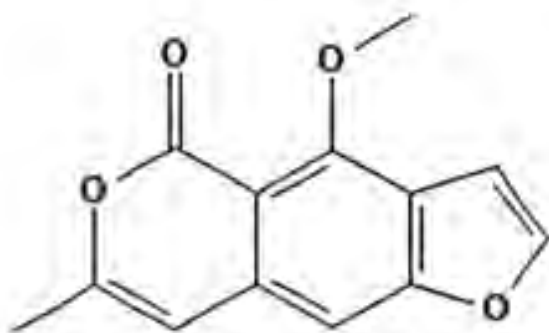


Figure 2. Coriandrin: C₁₃H₁₀O₄.

Eucalyptus L'Hér

It is native to Australia and Tasmania, with some species identified in New Guinea, the Philippines, and Indonesia[A19]³⁰. The widest plant genus belongs to the Myrtaceae family, covering 90% of the tropical areas established in 1955. [A20] It was first cultivated outside its native habitat in Portugal, and then it was subsequently widely distributed in Europe, Latin America, Asia, and Africa. Among the most prominent countries are United States, Ecuador, Colombia, Chile, China, Spain, Israel, Ethiopia, Morocco, South Africa, and Uganda³¹. The essential oils of *Eucalyptus* L'Héare known to be rich in a monoterpene for medicinal use called eucalyptol (1,8-cineole)^{32,33}. [A21] Varieties such as *Eucalyptus globulus* have been demonstrated possess in their chemical composition eucalyptol (63.81%) [A22] [A23]³⁴, pinene [A24] (16.06%), aromadendrene (3.68%), and o.-cymene (2.35%)³³. Eucalyptol is an organic, liquid, and colorless compound. It is a cyclic ether and a monoterpene³⁵. *Eucalyptus* extract has been shown activity against SARS-CoV at the concentration of 100 μM, similar to the Ginsenoside-Rb1, one of the traditional Chinese herb's pharmacologically active components *Panax ginseng*^{36,37}. A potential activity against SARS-Cov-2 of the molecules Eucalyptol and Jensenone was demonstrated [A25] by molecular docking using the main protease (Mpro) / chymotrypsin-like known as protease (3CLpro) of COVID-19 as a binding target, represents a potential target for inhibition of Coronavirus replication³⁸⁻⁴⁰. Since it

plays a vital role in the necessary processing of polyproteins in the replication of Coronavirus, this affinity of the Eucalyptol and Jensenone molecules should be studied in more detail for their potential use as SARS-CoV-2 inhibitors³⁵.

Morus alba[A26] L.

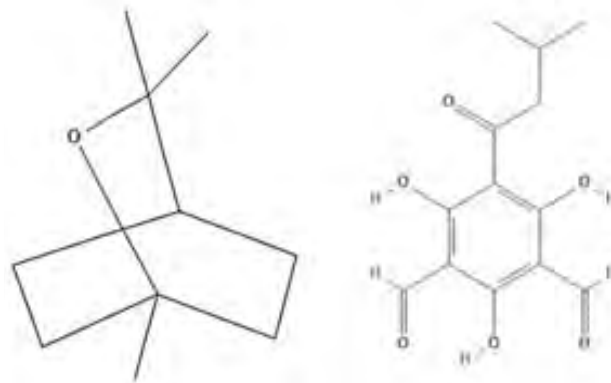


Figure 3. Eucalyptol: C₁₀H₁₈O; Jensenone: C₁₃H₁₄O₆.

The *Morus* genus belongs to the Moraceae family [A27] and has 24 species of at least 100 varieties. However, *Morus spp* has spread throughout the world[A28]⁴¹. It is believed that its origin is in Asia. *Morus* species are known for their medicinal uses as antibacterial and antifungal properties reported in many regions of the world. Molecules such as flavonoids, benzofurans, stilbenes, polyhydroxy alkaloids, and kivanons are responsible for this pharmacological properties⁴². Studies in *Morus alba* have determined 1- deoxynojirimycin, which has antiviral effects against the hepatitis B and C viruses^{43,44}. [A29] The juice and seeds of this plant species can have a positive impact on human health since it is rich in polyphenols, which are responsible for multiple biological activities, such as antiviral activity against influenza virus strains A / Brisbane / 59/2007 (H1N1), pandemic A / Korea / 01/2009 (H1N1) and B / Florida / 4 / 2006⁴⁵. The anti-Human Coronavirus (HCoV) [A30]⁴² 229E properties were demonstrated by the cytopathogenic effect's in vitro antiviral activity, favorable results were obtained for the 1-deoxynojirimycin, kuwanon G, mulberroside A molecules present in the *Morus alba* species. These molecules' antiviral mechanisms require additional studies to determine whether they are based on blocking viral entry into the host cell or inhibiting viral replication⁴².

Salvia Rosmarinus[A31] L.

This aromatic plant with needle-shaped leaves belongs to the Lamiaceae family[A32], and it is cultivated throughout the world⁴⁶. [A33] Rosemary has therapeutic properties and has been used in popular medicine as antifungal, antibacterial, anti-inflammatory, anti-tumor, antithrombotic, antiviral, antidepressant antioxidant^{47,48}. [A34] [A35] Some flavonoids have been identified (ericiotrin, luteolin 3'-O- β-D-glucuronide, hesperidin, diosmin, isoscutellarein 7-O-glucoside, hispidulin 7-O-glucoside, and genkwanin)^{49,50}. [A36] Other molecules described with potential bioactivity are carnosol, carnosic, rosmarinic, ursolic, oleanolic, and micrometric acid⁴⁷. The Oleanolic acid, rosmarinic acid, and ursolic acid were used to determine the antiviral activity against SARS-CoV-2[A37]⁵¹⁻⁵³ by molecular docking analysis, obtaining favorable results and establishing these molecules as potential inhibitors of the SARS-CoV-2 virus¹⁴.

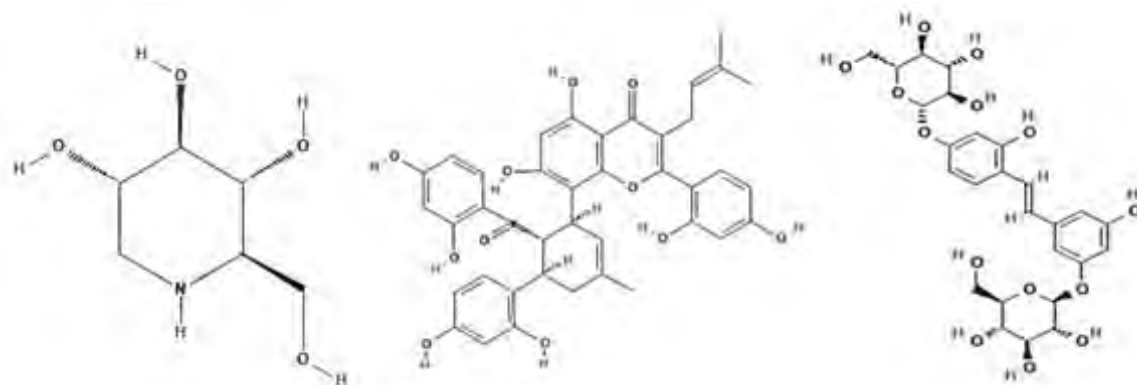


Figure 4. 1 Deoxynojirimycin: $C_6H_{13}NO_4$; Kuwanon G: $C_{40}H_{36}O_{11}$; Mulberroside A: $C_{26}H_{32}O_{14}$.

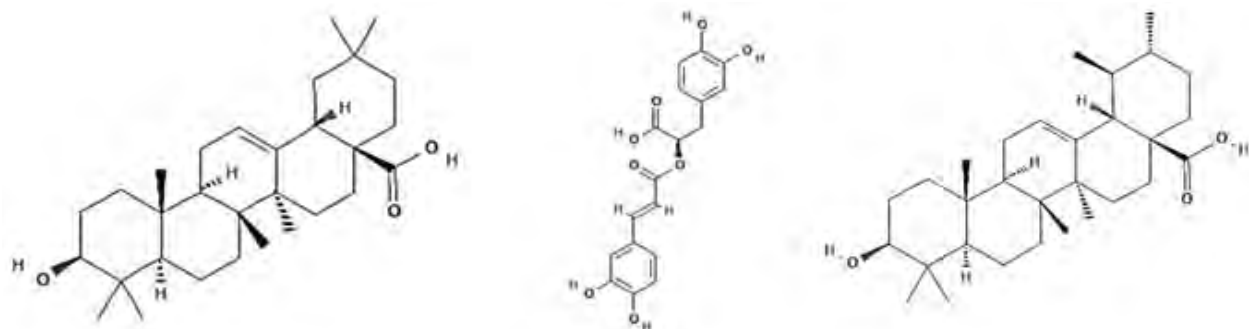


Figure 5. Oleanolic acid: $C_{30}H_{48}O_3$; Rosmarinic acid: $C_{18}H_{16}O_8$; Ursolic acid: $C_{30}H_{48}O_3$.

Azadirachta indica[A38] A. Juss

Belonging to the Meliaceae family[A39], this plant has been used to cure multiple diseases in different parts of Asia and Africa, one of the first plants mentioned in Siddha medicine, the oldest medical system known to humanity⁵⁴. *In vivo* studies with aqueous extract have revealed that the maximum non-toxic concentrations of 120-30 mg/mL resulted [A40] in inhibiting the virus replication (Dengue Virus type-2)⁵⁵. Polyphenolic flavonoids extracted from fresh Neem leaves show antibacterial and antifungal activities. On the other hand, the extract of Neem bark at a variable concentration of 50 to 100 μ g / mL can stop the entry of Herpes Virus Simplex (HSV-1) into cells⁵⁶. This plant's use in treating infections of various viruses such as poliovirus, bovine herpesvirus type 1, duck plague virus has also been reported⁵⁷. Molecules present in this plant species, such as Nimbaflavone, rutin, and Hyperoside, have shown a potential inhibition in influenza viruses (H1N1, H1N2, H2N2, H2N3, H5N1, H7N2, H7N3, H7N7, and H9N2) by exhibiting extensive antiviral properties⁵⁸.

Cinchona pubescens[A41] Vahl

It is one of the 23 species of the *Cinchona* genus[A42] that belongs to the Rubiaceae family[A43]. It has widely been introduced in many parts of the world as Bolivia, Colombia, Ecuador, and Peru for its source of quinine⁵⁹. Quinine is the component of a popular malarial drug, but despite being useful in malaria, its bark has an unacceptable risk of toxicity due to a lack of optimization in the quinine dose⁶⁰. Potential anti-SARS-CoV-2 inhibition of the quinine molecule has been demonstrated by molecular docking analysis using the 6LU7 COVID-19 protease as a target. The results are recommending the molecule for further studies for its potential inhibition⁵⁶.

Potential bioactive compounds

Table 1 details the studies on compounds from medicinal plants that grow in Ecuador with potential inhibition against SARS-CoV-2. The species *Azadirachta indica* is included in this list despite not reporting studies for this virus due to the number of biological evaluations carried out as antiviral.

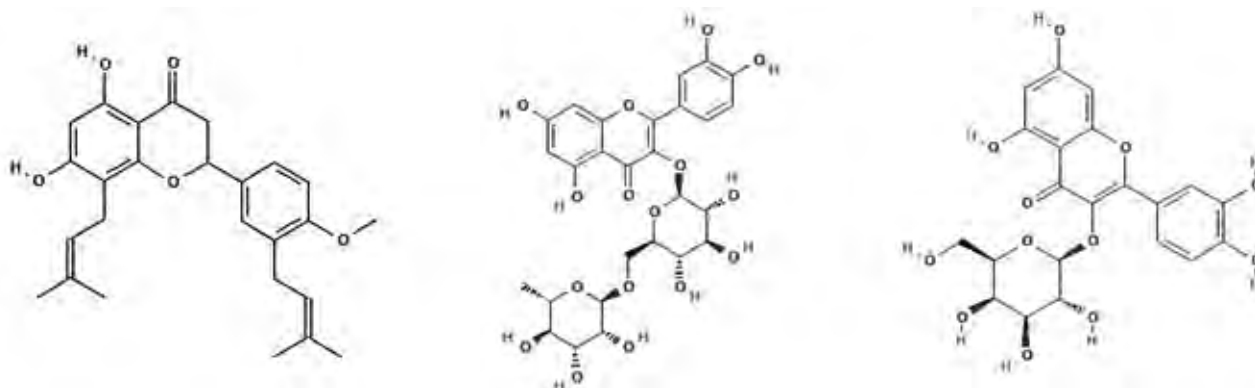


Figure 6. Nimbaflavone: $C_{26}H_{30}O_5$; Rutina: $C_{27}H_{30}O_{16}$; Hyperoside: $C_{21}H_{20}O_{12}$.

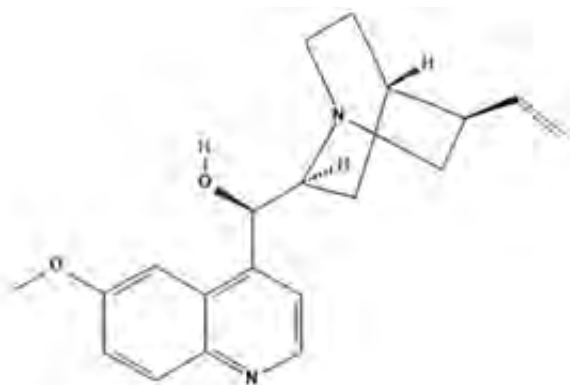


Figure 7. Quinine: $C_{20}H_{24}N_2O_2$.

Name	Active ingredient /pharmacological action	Methodology	Mechanism of action	Ref.
<i>Curcuma longa L</i> Common name: Turmeric	Pharmacological action: -Antiviral activities, -They have an anti-SARS-CoV 2 component	Molecular docking analysis	The binding affinity of the active molecule to the COVID-19 6LU7 and 6Y2E proteases expressed in kcal/mol	14
<i>Coriandrum sativum L</i> Common name: Coriander	Pharmacological action: -Antiviral activities, They have an anti-SARS-CoV 2 component	Molecular docking analysis	The binding affinity of the active molecule to the COVID-19 6LU7 and 6Y2E proteases expressed in kcal/mol	14
<i>Morus alba L</i> Common name: Mulberry	Pharmacological action: -Antiviral activities -They have anti HCoV 229 components	<i>In vitro</i> antiviral activity of the cytopathogenic effect	<i>These molecules' antiviral mechanisms require further study to determine whether they are based on blocking viral entry into the host cell or inhibiting viral replication.</i>	42
<i>Salvia rosmarinus L</i> Common name: Rosemary	Pharmacological action: -Antiviral activities, -They have an anti-SARS-CoV 2 components	Molecular docking analysis	The binding affinity of the active molecule to the COVID-19 6LU7 and 6Y2E proteases expressed in kcal/mol	14
<i>Azadirachta indica A. Juss</i> Common name: Neem	Pharmacological action: Inhibits influenza virus (H1N1, H1N2, H2N2, H2N3, H5N1, H7N2, H7N3, H7N7 and H9N2)	Molecular docking analysis	The binding affinity of the active molecule to nucleoproteins of influenza virus strains to avoid their replication expressed in kcal/mol	58
<i>Cinchona pubescens Vahl</i> Common name: Husk	Pharmacological action: Potential inhibition of SARS-CoV 2	Molecular docking analysis	The binding affinity of the active molecule to the COVID-19 6LU7 protease expressed in kcal/mol	56,61
<i>Eucalyptus L'Hér</i> Common name: Eucalyptus	Pharmacological action: Potential inhibition of SARS-CoV 2	Molecular docking analysis	The binding affinity of the active molecule to COVID-19 proteases (Mpro / 3CL pro) expressed in kcal/mol	62

Table 1. Bioactive compounds with potential inhibition against SARS-CoV-2.

Conclusions

Seven medicinal plants that grow in Ecuador have potential use for the treatment of COVID-19: *Azadirachta indica*, *Cinchona pubescens*, *Coriandrum sativum*, *Cúrcuma longa*, *Eucalyptus spp*, *Morus alba*, *Salvia rosmarinus*. The literature reported for these species 11 bioactive compounds against

SARS-Cov-2. This report provides a baseline for further studies to validate the antiviral potential of these plant species.

Funding

This research is funded by the Center for Biotechnological Research of Ecuador to be part of its research lines.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Bibliographic references

- Ministerio de Salud Pública. Actualización de casos de coronavirus en Ecuador. 2020.
- Pan American Health O. Ongoing living update of potential COVID-19 therapeutics: summary of rapid systematic reviews. 2020:17.
- Vacas C, Medina D, Ñíguez J, Navarrete H. Los Kichwas del Alto Napo y sus plantas medicinales. edipuce. 2017. 112 p.
- Vigyan Kendra K, Preeti Kumari I, Kumar Maurya Scholar R, Kumar V, Kumar Verma R, Kumari P, et al. Medicinal properties of turmeric (*Curcuma longa* L.): A review. *Int J Chem Stud*. 2018;6(4):1354–7.
- FDA. Summary of safety data and food usage conditions for conclusion of general recognition of safety of BCM-95® (Curcumin). Landing; 2016.
- Lv Y, Gong L, Wang Z, Han F, Liu H, Lu X. et al. Curcumin inhibits human cytomegalovirus by downregulating heat shock protein 90. *Mol Med Report*. 2015;12:4789–4793. doi: 10.3892/mmr.2015.3983.
- Ranjan D, Siquijor A, Johnston T, Wu G et al. The effect of curcumin on human B-cell immortalization by Epstein-Barr virus / Discussion. In: Atlanta. 1998. p. 47–51.
- Kapadia G, Azuine M, Tokuda H, Hang E, Mukainaka T, Nishino H. Inhibitory effect of herbal remedies on 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-promoted Epstein-Barr virus early antigen activation. *Pharmacol Res*. 2002;45(3):213–20. doi: doi.org/10.1006/phrs.2001.0936.
- Praditya D, Kirchhoff L, Brüning J, Rachmawati H, Steinmann J. Anti-infective properties of the golden spice curcumin. *Front Microbiol*. 2019;10:912. doi: 10.3389/fmicb.2019.00912.
- Ali A, and Banerjee A. Curcumin inhibits HIV-1 by promoting tat protein degradation. *Sci Rep*. 2016;6:27539. doi: 10.1038/srep27539.
- Lin X, Ammosova T, Kumari N, and Nekhai S. Protein phosphatase-1 -targeted small molecules, iron chelators and curcumin analogs as HIV-1 antivirals. *Curr Pharm Des*. 2017;23:4122–4132. doi: 10.2174/1381612823666170704123620.
- Han S, Xu J, Guo X, and Huang M. Curcumin ameliorates severe influenza pneumonia via attenuating lung injury and regulating macrophage cytokines production. *Clin Exp Pharmacol*. 2018;45:84–93. doi: 10.1111/1440-1681.12848.
- Mathew D, Hsu W. Antiviral potential of curcumin. *J Funct F*. 2018;40:692–9.
- Sampangi-ramaiah MH, Vishwakarma R, Shaanker RU. Molecular docking analysis of selected natural products from plants for inhibition of SARS-CoV-2 main protease. *Curr*. 2019.:1087–92. 10.18520/cs/v118/i7/1087-1092.
- Sourav D, Sharat S & ASR. An investigation into the identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using molecular docking study. *J Biomol Struct Dyn*. 2020. doi: 10.1080/07391102.2020.1763201.
- Tien H, Haoran W. In Silico Exploration of Molecular mechanism of clinically oriented drugs for possibly inhibiting SARS-CoV-2's Main Protease. *J Phys Chem Lett*. 2020;1–26. doi: 10.1021/acs.jpcclett.0c00994.
- Nivetha R, Bhuvaragavan S et al. Inhibition of multiple SARS-CoV-2 proteins by an antiviral biomolecule, seselin from Aegle marmelos deciphered using molecular docking analysis. *Res Sq*. 2020. doi: 10.21203/rs.3.rs-31134/v1.
- Jiménez G, Vargas A, Delgado N, Gustavo E, Olivos G, Sheen P, Manolo P. High-Throughput Virtual Screening of 4487 flavonoids: New insights on the structural inhibition of SARS-CoV-2 Main Protease. *arXiv Biomol*. 2020.
- Adhikari N, Amin S. dissecting the drug development strategies against SARS-CoV-2 through diverse computational modeling techniques. in: . methods in pharmacology and toxicology. Springer. 2020. doi: https://doi.org/10.1007/7653_2020_46.
- Morales P. Herbs and leaf crops: Cilantro, Broadleaf Ilantro, and vegetable Amaranth. *Encycl Life Support Syst Soils, plant growth Crop Prod United Nations Educ Sci Cult Organ*. 2011.
- Fayyad A, Ibrahim N, Yaakob W. Evaluation of biological activities of seeds of *Coriandrum sativum*. *Int J Sci Eng Res*. 2017;8(7):1058-1063.
- Kumar S, Kashyap P, Chowdhury S, Kumar S, Panwar A. Identification of phytochemicals as potential therapeutic agents that binds to Nsp15 protein target of Coronavirus (SARS-CoV-2) that are capable of inhibiting virus replication. *Phytomedicine*. 2020. doi: https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153317.
- Das G, Ghosh S, Garg S, Ghosh S, Jana A, Samat R, Ghosh S. An overview of key potential therapeutic strategies for combat in the COVID-19 battle. *RSC Adv*. 2020;10(47):28243–28266. doi: 10.1039/D0RA05434H.
- Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, Zhang Q, Shi X, Wang Q. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020;(581):215–20. doi: https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5.
- Letko M, Marzi A & Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol*. 2020;(5):562–569. doi: https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y.
- Yi C, Sun X, Ye J et al. Key residues of the receptor binding motif in the spike protein of SARS-CoV-2 that interact with ACE2 and neutralizing antibodies. *Cell Mol Immunol*. 2020;(17):621–630. doi: https://doi.org/10.1038/s41423-020-0458-z.
- Tai W, He L, Zhang X, Pu J, Voronin D, Jiang S, et al. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel Coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell Mol Immunol*. 2020. doi: 10.1038/s41423-020-0400-4.
- Zhang L, Lin D, Sun X, Curth U, Drosten C, Sauerhering L, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science (80-)*. 2020;368(6489):409–12. doi: 10.1126/science.abb3405.
- Hussain F, Jahan N, Rahman K-, Bushra S, Saba J. Identification of Hypotensive Biofunctional Compounds of *Coriandrum sativum* and Evaluation of Their Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibition Potential. *Oxid Med Cell Longev*. 2018. doi: 10.1155/2018/4643736.
- Timothy D. Paine, Martin J. Steinbauer SAL. Native and exotic pests of *Eucalyptus*: A worldwide perspective. *Annu Rev Entomol*. 2011;56:181–201. doi: https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120709-144817.
- Bayle G. Ecological and social impacts of eucalyptus tree plantation on the environment. *J biodivers Conserv bioresour Manag*. 2019;5(1):93–104. doi: https://doi.org/10.3329/jbcbm.v5i1.42189.
- Mulyaningsih S, Sporer F, Reichling J, Wink M. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. *Pharm Biol*. 2011;49(9):893–9. doi: 10.3109/13880209.2011.553625.
- Ángelo L, Duarte A, Gominho J, Domingues F. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Ind Crops Prod*. 2016;79:274–82. doi: https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.055.
- Boukhatem M, Boumaiza A, Nada H, Rajabi M. *Eucalyptus globulus* essential oil as a natural food preservative: antioxidant, antibacterial and antifungal properties in vitro and in a real food matrix (orangina fruit juice). *Appl Sci*. 2020;10:5581. doi: https://doi.org/10.3390/app10165581.
- Sharma A, Kaur I. *Eucalyptol* (1,8 cineole) from *Eucalyptus* essential oil a potential inhibitor of COVID 19 corona virus infection by Molecular docking studies. *Preprints*. 2020;59–66. doi: 10.20944/preprints202003.0455.v1.
- Helms S. Cancer prevention and therapeutics: *Panax ginseng*. undefined. 2004.
- Wu C, Jan J, Ma S, Kuo C, Juan H, Cheng Y, et al. Small molecules targeting severe acute respiratory syndrome human Coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(27):10012–7. doi: 10.1073/pnas.0403596101.

38. Arun D, Sharma I. Eucalyptus essential oil bioactive molecules from against SARS-CoV-2 spike protein: Insights from computational studies. *Res Sq*. 2021. doi: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-140069/v1>.
39. Jahan I. Potentials of plant-based substance to inhabit and probable cure for the COVID-19. *Turk J Biol*. 2020.44(3):228–41. doi: [10.3906/biy-2005-114](https://doi.org/10.3906/biy-2005-114).
40. Asif M, Saleem M, Saadullah M. COVID-19 and therapy with essential oils having antiviral, anti-inflammatory, and immunomodulatory properties. *Inflammopharmacol*. 2020.28:1153–61. doi: <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00744-0>.
41. Vijayan K, Ravikumar G. TA. Mulberry (*Morus* spp.) Breeding for Higher Fruit Production. In: Al-Khayri J., Jain S., Johnson D. (eds) *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits*. Springer, Cham. 2018.
42. Thabti I, Albert Q, Philippot S, Dupire F, Westerhuis B, Fontanay S, et al. Advances on Antiviral Activity of *Morus* spp. Plant Extracts: Human Coronavirus and Virus-Related Respiratory Tract Infections in the Spotlight. *Molecules*. 2020.25:1876. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25081876>.
43. Liu C, Xiang W, Yu Y, Zheng-Qin S, Xian-Zhi H. Comparative analysis of 1-deoxynojirimycin contribution degree to α -glucosidase inhibitory activity and physiological distribution in *Morus alba* L. *Ind Crops Prod*. 2015.70:309–15. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.046>.
44. James J, Keith M, Jung-Eun Y, Tennant T. Natural Iminosugar Derivatives of 1-Deoxynojirimycin Inhibit Glycosylation of Hepatitis Viral Envelope Proteins. *J Microbiol*. 2007.45(5):431–40.
45. Kim H, Chung MS. Antiviral activities of mulberry (*Morus alba*) juice and seed against influenza viruses. Evidence-based Complementary Altern Med. 2018. doi: [10.1155/2018/2606583](https://doi.org/10.1155/2018/2606583).
46. Ribeiro R, Carvalho D, Cavaleiro C, Costa H, Gonçalves T, Conceição M, Ramos F, Melo N. A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends Food Sci Technol*. 2015.45(2):355–68. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.015>.
47. Macedo L, Mendes É, Milit L, Tundisi L, Souto E, Mazzola P. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L., syn *Salvia rosmarinus* Spenn.) and Its Topical Applications: A Review. *Plants*. 2020.9 (5)(651):1–12. doi: <https://doi.org/10.3390/plants9050651>.
48. Patel A, Tiwari S, Pandey N, Gupta D, & Prasad S. Role of spices beyond a flavouring agent: the antioxidant and medicinal properties. *Ethnopharmacol Investig Indian Spices*. 2020.5–35. doi: [10.4018/978-1-7998-2524-1.ch002](https://doi.org/10.4018/978-1-7998-2524-1.ch002).
49. del Baño M, Lorente J, Castillo J, Benavente O, Piedad M, Del Río J, Ortuño A. Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Postulation of a biosynthetic pathway. *J Agric Food Chem*. 2004.52(16):4987–4992. doi: <https://doi.org/10.1021/jf040078p>.
50. Al-Snafi A. Phenolics and flavonoids contents of medicinal plants, as natural ingredients for many therapeutic purposes- A review. *IOSR J Pharm*. 2020.10(7):42–81.
51. Maurya D. Evaluation of traditional ayurvedic preparation for prevention and management of the novel Coronavirus (SARS-CoV-2) using molecular docking approach. *ChemRxiv*. 2020. doi: <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12110214.v1>.
52. Adithya J, Bhagyalakshmi, Aishwarya S, Nath LR. The plausible role of Indian traditional medicine in combating corona virus (SARS-CoV 2): a mini-review. *Curr Pharm Biotechnol*. doi: <https://doi.org/10.2174/1389201021666200807111359>.
53. Pawelczyk A, & Zaprutko L. Anti-COVID drugs: repurposing existing drugs or search for new complex entities, strategies and perspectives. *Futur Med Chem*. 12(19). doi: <https://doi.org/10.4155/fmc-2020-0204>.
54. Gupta S, Prasad S, Tyagi A KA & AB. Neem (*Azadirachta indica*): An Indian traditional panacea with modern molecular basis. *Phytotherapy*. 2017.34:14–20.
55. Parida M, Upadhyay C, Pandya G & JA. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on dengue virus type-2 replication. *J Ethnopharmacol*. 2002.79(2):273–8. doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00395-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00395-6).
56. Srivastava A, Kumar A, Tiwari G, Kumar R, Misra N. In Silico Investigations on the Potential Inhibitors for COVID-19 Protease. Preprints. 2020.1–12.
57. Tripathi A, Sinha S. y Dwivedi B. Tripathi A, Sinha S, & Dwivedi B. An Attempt to Evaluate Antiviral Activity of Plant Extracts to Combat Infections Caused by Viruses Including SARS COV-2. 2020. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3599444>.
58. Ahmad A, Javed M, Rao A, Husnain T. Designing and screening of universal drug from neem (*Azadirachta indica*) and standard drug chemicals against influenza virus nucleoprotein. *BMC Complement Altern Med*. 2016.16(1):1–8. doi: [10.1186/s12906-016-1469-2](https://doi.org/10.1186/s12906-016-1469-2).
59. Jäger H. Quinine tree invasion and control in Galapagos: A Case Study. In: Torres M, Mena C, editors. *Understanding invasive species in the Galapagos Islands*. Springer, Cham; 2018. p. 69–76.
60. Faisal R, Shinwari L, Aziz I, Khalil AT. Therapeutic and adverse effects of commonly used medicinal plants: Standardization and quality assurance. *Proc Pakistan Acad Sci Part B*. 2019.56(3BSpecial Issue):1–9.
61. Jomsky M. Could low-dose quinine prevent or treat coronavirus infection? *EC Pharmacol Toxicol*. 2020.(March):6–9.
62. Sharma A, Kaur I. Molecular docking studies on Jensenone from Eucalyptus essential oil as a potential inhibitor of COVID 19 corona virus infection. Preprints. 2020.(March). doi: [10.20944/preprints202003.0455.v1](https://doi.org/10.20944/preprints202003.0455.v1).

Received: 15 December 2020

Accepted: 20 January 2021

NEWS AND VIEWS

El potencial de la biodiversidad nativa para el desarrollo de la bioeconomía regional- El caso del calafate

The potential of native biodiversity for the development of the regional bioeconomy- The case of Calafate

D. Dalzotto¹, L. Piñuel¹, P. Boeri¹, S. Sharry^{2*}

DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.31

1659

Resumen: El modelo de producción actual de agricultura y ganadería enfrenta una serie de problemas que ponen en riesgo la seguridad alimentaria de la humanidad, obligándonos a buscar modelos económicos más sostenibles. En este sentido, la bioeconomía es una alternativa, y el uso de la flora regional y la reutilización de residuos industriales para obtener subproductos son algunos de sus pilares. En la Patagonia se consume una gran cantidad de plantas nativas, reconocidas por los beneficios que aportan a la salud humana, como el calafate (*Berberis microphylla*). Esta especie ha sido ampliamente estudiada por contener biocompuestos en sus frutos, tallos, hojas y raíces, con potencial para las industrias farmacéutica y alimentaria. El calafate es un recurso muy apreciado en esta zona, ya que sus frutos se utilizan para elaborar productos alimenticios regionales. Las semillas de esta especie constituyen un subproducto de este proceso. Sin embargo, las semillas se han propuesto recientemente como una fuente promisoría de proteínas y péptidos con actividad antioxidante. En un contexto bioeconómico, estas propiedades las convierten en un recurso potencial para la industria alimentaria, cuya composición y actividades biológicas necesitan ser estudiadas con mayor profundidad.

Palabras clave: *Berberis sp.*, compuestos bioactivos, polifenoles, péptidos, Patagonia.

Abstract: The current production model of agriculture and livestock faces many problems that put humanity's food security at risk, forcing us to seek more sustainable economic models. In this sense, bioeconomy is an alternative, and the use of regional flora and the reuse of industrial waste to obtain by-products are some of its pillars. In Patagonia, many native plants are consumed, recognized for their benefits for human health, such as the Calafate (*Berberis microphylla*). This species has been widely studied for containing biocomposites in its fruits, stems, leaves, and roots, with potential for pharmaceutical and food industries. The Calafate is a highly appreciated resource in this region since the fruits are used to prepare regional food products. The seeds of this species constitute a by-product in the process. However, seeds have recently been proposed as a promising source of proteins and peptides with antioxidant activity. These properties make them a potential resource for the food industry in a bioeconomic context, whose composition and biological activities need further study.

Key words: *Berberis sp.*, bioactive compounds, polyphenols, peptides, Patagonia.

Introducción

El modelo productivo de agricultura y ganadería actual se enfrenta a una serie de problemáticas que ponen en riesgo la seguridad alimentaria de la humanidad. Entre las más discutidas se encuentra: la homogeneización de la dieta mundial a un reducido número de cultivos específicos, la pérdida de la variabilidad genética de los cultivos tradicionales producto de la domesticación, la permanente amenaza a la biodiversidad debido a la destrucción de hábitats naturales por el avance de la frontera agrícola y el desperdicio o pérdida de alimentos en la cadena de producción y consumo de los mismos^{1,2,3}.

A pesar de la crisis alimentaria mundial que afecta a 135 millones de personas⁴, se estima que una tercera parte de los alimentos producidos se pierden y desperdician a lo largo de toda la cadena alimentaria, producto de un funcionamiento ineficiente en los sistemas productivos y de abastecimiento (producción, procesamiento, almacenamiento transporte y distribución)^{5,6}. En este contexto, la reducción de la pérdida mundial per cápita de alimento fue incluida dentro de los Objetivos de Desarrollo Sostenible⁷. Esta problemática tiene un gran impacto económico, social y ambiental, a nivel mundial y regional.

Este panorama obliga a enfrentar una revisión profunda de los sistemas productivos y a la necesidad de construir esquemas de vida más sustentables. Surgen entonces, nuevas alternativas tecnológicas para convertir los residuos agrícolas en subproductos de valor y diversificar la matriz productiva. Ante la necesidad de un modelo productivo eficiente que mitigue los impactos negativos del modelo económico actual, surge la bioeconomía, definida en la Segunda Cumbre mundial de Bioeconomía como "la producción, utilización y conservación de recursos biológicos, incluyendo los conocimientos, la ciencia, la tecnología y la innovación relacionados, para proporcionar información, productos, procesos y servicios en todos los sectores económicos, con el propósito de avanzar hacia una economía sostenible"⁸. En términos de territorio, la bioeconomía enfatiza las oportunidades para los territorios rurales y periféricos, que pueden resultar en procesos y productos de alta calidad con identidad territorial; de hecho, la bioeconomía habilita el desarrollo de economías localmente integradas⁹. En este contexto, es importante que cada país enfatique la implementación y desarrollo de políticas orientadas hacia la

¹ Universidad Nacional de Río Negro, Sede Atlántica, Viedma, Argentina.

² Laboratorio de Investigaciones en Maderas (LIMAD), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Universidad Nacional de Río Negro, Sede Atlántica, Viedma Argentina.

bioeconomía a nivel regional y local para favorecer la descentralización de la producción. Así, se disminuyen los costos de transporte y se facilita el desarrollo económico en las áreas rurales, adaptando la producción a las características ambientales y a la utilización de materia prima de la región^{10,11}.

El desarrollo de una bioeconomía basada en la biodiversidad ofrece varias posibilidades para el aprovechamiento de los recursos y los procesos biológicos. En este sentido, la bioprospección (búsqueda de nuevas fuentes de compuestos con valor económico actual o potencial a partir de especies biológicas) es una herramienta útil para conocer la biodiversidad regional¹². Así, esta herramienta ha permitido avanzar hacia caracterizaciones químicas de extractos o fracciones con actividad biológica de interés para la industria medicinal y biotecnológica. Conocer los recursos naturales regionales y orientar las actividades científicas hacia la bioprospección permite incorporar valor agregado, generar productos con identidad local y diversificar las actividades productivas asociadas a la industria regional además de disminuir la generación de residuos. En relación con actividades bioeconómicas, el uso de ingredientes y materias primas derivados de especies nativas es cada vez de mayor interés en la industria de alimentos procesados, de cosméticos, plantas medicinales, extractos botánicos, aceites esenciales, entre otras. En este sentido, el potencial económico del uso de la biodiversidad es alto, con tasas de crecimiento en el mercado de entre 8% y 10%¹³.

Este trabajo pretende presentar un estudio de caso sobre las potencialidades de la biodiversidad nativa para diversificar la matriz productiva regional, en el marco de un desarrollo bioeconómico.

La potencialidad de los *Berberis* spp. como especies de interés bioeconómico

El género *Berberis* pertenece a la familia Berberidaceae e incluye alrededor de 500 especies distribuidas alrededor del mundo, con su centro de diversidad en el sur de Asia y centro y sur de América^{14,15,16}. Se presentan como arbustos espinosos con una gran plasticidad ecológica que les permite adaptarse a una gran variedad de condiciones climáticas y edáficas¹⁷.

Las plantas del género *Berberis* presentan un gran número de utilidades. Sus frutos, generalmente de color negro azulado, carnosos y jugosos, de sabor agridulce, son consumidos frescos o preparados en dulces, jaleas y jarabes^{18,19}. En los últimos años, la demanda de estos berries ha aumentado, tanto para consumo fresco como para la elaboración de productos

regionales como mermeladas, helados, bebidas sin alcohol, licores y productos cosméticos. En este sentido, el Código Alimentario Argentino ha incorporado algunas especies de este género como "frutas nativas de la zona andina", autorizando la venta de sus frutos frescos y su uso como aditivos en algunos productos alimenticios²⁰.

Las especies de *Berberis* han sido históricamente aprovechadas como ornamentales y medicinales²¹. Presentan una gran cantidad de metabolitos secundarios como las antocianinas, ampliamente utilizadas en la industria alimenticia como colorantes naturales²². Recientemente, han sido determinadas propiedades medicinales en sus raíces, tallos, hojas y frutos, atribuidas a la presencia de una gran cantidad de compuestos bioactivos, de los cuales los más estudiados e identificados han sido los alcaloides y polifenoles^{23,24}. Entre los beneficios asociados a estos compuestos, se encuentran la actividad antioxidante, antibacteriana, antidiabética, antiinflamatoria, antitumoral, anticonvulsiva, antihipertensiva y su efecto antinociceptivo¹⁴.

El calafate, un fruto de interés particular

Berberis microphylla G. Forst, conocida como "calafate" o "michay", es una especie multipropósito de la región patagónica que se distribuye desde la provincia de Neuquén hasta Tierra del Fuego²⁵. Es un arbusto de hasta 3 m de altura que florece en primavera; sus flores son de un llamativo color amarillo, por lo cual se las usa a menudo como arbustos ornamentales²⁶. Los frutos maduran hacia mediados del verano, dando una baya de alto valor comestible, de color azul negruzco de 7-11 mm de diámetro, que posee de 6 a 10 semillas marrones o negras, de 4-6 mm de largo (Fig. 1).

El calafate es una planta que ha sido históricamente utilizada por las comunidades nativas para tratar la fiebre, la inflamación, el dolor de estómago, la diarrea, la infección del tracto urinario, la infección de la garganta, la gingivitis y problemas hepáticos²⁷. Además, ha significado una fuente de tinturas naturales, desde un color amarillo brillante obtenido de los taninos de sus raíces hasta pigmentos de un morado violáceo debido a las antocianinas de la pulpa de su fruto^{26,28}. En este sentido, esta especie es una parte importante de las tradiciones y leyendas vitales de la región, así como un aspecto relevante del patrimonio biocultural local²⁹.

Actualmente, los productores han mostrado un creciente interés en el uso de estos frutos, siendo muy atractivo para el establecimiento de plantaciones comerciales, dada la gran

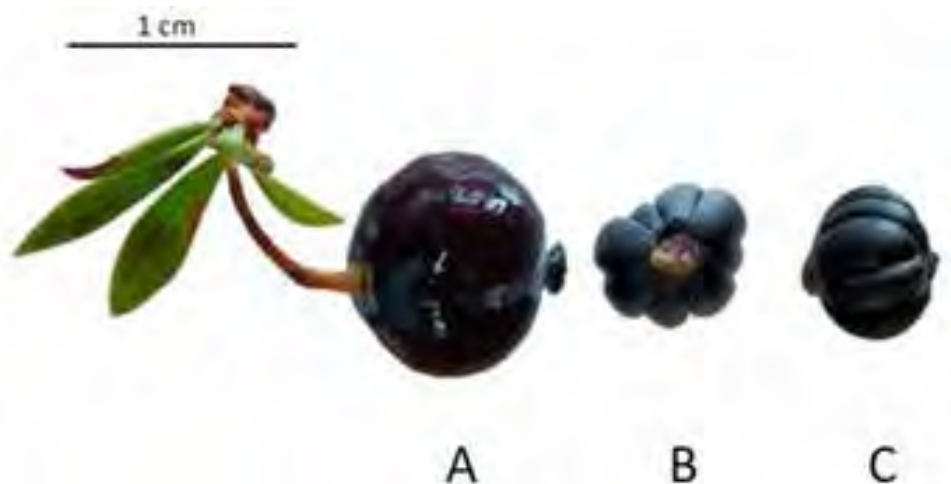


Figura 1. A) Fruto completo de *B. microphylla*. (B) Semillas del fruto vistas desde arriba. (C) Semillas del fruto vistas desde el costado.

variedad de productos que pueden obtenerse de esta especie. En la norpatagonia el consumo de frutas frescas, como las del calafate, es una práctica habitual, ya que ha sido una fuente de alimentos y medicinas desde tiempos prehistóricos^{30,31,32}. Debido a su popular uso en productos de calidad regional, sus frutos han sido estudiados con el objetivo de determinar sus compuestos bioactivos con potencial uso en la industria farmacéutica, alimenticia y cosmética^{25,33,34}.

Propiedades funcionales del calafate

En la actualidad se vincula una dieta basada en el consumo de frutas y verduras con la prevención de diferentes enfermedades³⁴. Así, se han estudiado numerosas especies vegetales debido a los beneficios que producen a la salud humana, como es el caso de varios berries patagónicos que han sido reconocidos como "superfrutas". Dicho término se utiliza para referirse a frutos con gran valor nutricional que generan beneficios para la salud humana. Tanto en Argentina como en Chile, el calafate ha sido reconocido como una superfruta habiéndose documentado su contenido de polifenoles y su capacidad antioxidante en diferentes regiones de la Patagonia³⁴⁻⁴¹. Los frutos del calafate superan en su poder antioxidante a otras frutas de referencia, como las naranjas, arándanos y frutillas^{36,39,41}.

Chamorro y colaboradores³⁸, además de evaluar la actividad antioxidante de extractos del fruto, probaron su efecto en el control de la hiperglucemia posprandial, y verificaron que los polifenoles presentes en el extracto no sólo poseían actividad antioxidante sino que inhibían la actividad de la enzima α -glucosidasa. Además, se ha comprobado un efecto antiinflamatorio *in vitro* de la pulpa de esta especie y su utilización ha sido sugerida para el tratamiento de la resistencia a la insulina^{39,42}. Si bien en la actualidad los frutos son la porción de mayor demanda por parte de la industria regional, las hojas, tallos, y raíces de esta especie han sido utilizadas antiguamente en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes patologías como la fiebre, inflamación, dolor de estómago, diarrea, infección del tracto urinario, infección de garganta, gingivitis y problemas hepáticos⁴³. De esta manera, ha sido estudiada la presencia de alcaloides de isoquinolina en hojas, tallos y raíz de *B. microphylla*, la berberina fue el alcaloide mayoritario en los órganos evaluados. Además, se describió la actividad antibacteriana selectiva de estos alcaloides contra cepas bacterianas gram-positivas^{43,44}.

Usos de las semillas del calafate para la obtención de nuevos subproductos

Como se mencionó anteriormente, la industria de alimentos registra una pérdida del 30% de la producción mundial⁶ y esta cifra alcanza toda la cadena agroalimentaria. Desde una perspectiva bioeconómica, se debe reducir las pérdidas de recursos y obtener "subproductos alimentarios" a través de la recuperación de compuestos funcionales con valor de mercado⁴⁵. En la actualidad, los desechos de procesamiento de frutas y verduras son sustratos ampliamente investigados como fuentes de biocompuestos con aplicación industrial⁴⁶. De esta manera, no sólo se disminuye la generación de residuos alimentarios, sino que además surge una oportunidad de obtener compuestos con potencial uso como suplementos alimentarios.

La pulpa de los frutos del calafate es ampliamente utilizada en la región patagónica para la elaboración de productos artesanales. En estos sistemas productivos, las semillas constituyen uno de los principales residuos, debido a que representan el 70% del fruto. En este sentido, al ser consideradas como

un descarte, las semillas del calafate no han sido evaluadas nutricionalmente. Recientemente, Boeri y colaboradores³⁶ informaron por primera vez, la caracterización nutricional de las semillas de esta especie y se determinó que el contenido de proteínas de la semilla es del 13.6%.

Actualmente, existe un creciente interés por la obtención de aislados y concentrados proteicos que ayuden a cubrir déficits nutricionales en la población. En este contexto, la búsqueda y evaluación de nuevas fuentes de proteínas y péptidos bioactivos ayudaría a mejorar la salud humana y contribuirá en la prevención de enfermedades crónicas. Dado que la preocupación de la industria alimenticia es la salud y el bienestar de los consumidores, el mercado de concentrados proteicos, ha aumentado en los países desarrollados. Actualmente, las proteínas y los péptidos de origen vegetal están cobrando cada vez más importancia en el área de la industria farmacéutica y de los alimentos. Su interés radica en que tienen la particularidad de proveer aminoácidos esenciales (valina, fenilalanina, treonina, triptófano, metionina, leucina, isoleucina y lisina), a los cuales se les han atribuido diferentes actividades biológicas^{47,48}.

La elección de la fuente de proteína puede evaluarse ya sea, considerando propiedades biológicas de interés para la salud humana o por la necesidad de agregar valor a proteínas subutilizadas. Este enfoque proporciona la oportunidad de diversificar el uso de las especies vegetales más allá de los propósitos básicos de nutrición. Generalmente, la mayor fuente proteica en las plantas se encuentra en la semilla, dado que estas moléculas están involucradas en el proceso de germinación y desarrollo embrional⁴⁹. En la actualidad, los grupos vegetales más comunes de los cuales se obtienen proteínas son los cereales y las leguminosas. En el caso particular del calafate, el contenido de proteínas registrado en las semillas por Boeri y colaboradores³⁶ fue superior al hallado en las semillas de otras especies del género. En este trabajo, se determinó además que la actividad antioxidante de los péptidos fue 1,2 veces superior que la del aislado proteico. Asimismo, Ruiz y colaboradores⁵⁰ registraron la presencia de algunos metabolitos poseen numerosas aplicaciones, como la berberina, ampliamente utilizada en la medicina⁵¹. Otros autores han evaluado los aceites extraídos de las semillas de otras especies de *Berberis* y sus posibles beneficios y aplicaciones industriales. Tavakoli y colaboradores⁵² enriquecieron el aceite de soja con aceite de semilla de *Berberis integerrima*, y lograron disminuir así la oxidación del aceite comercializado. Por otro lado, Kaya y colaboradores⁵³ enriquecieron películas comestibles basadas en una matriz de quitosano con aceite extraído de las semillas de *Berberis crataegina*. Este procedimiento no sólo mejoró las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de las películas de quitosano sino que además aumentó la hidrofobicidad del mismo, logrando películas menos solubles en agua. Los autores sostienen que este tipo de resultados poseen una importante influencia positiva en el envasado de alimentos dado que en la actualidad se utilizan productos derivados del petróleo.

Conclusiones

El calafate es una especie nativa de la Patagonia con gran potencialidad para promover la bioeconomía regional. Las semillas de esta especie, actualmente consideradas un residuo de la industria regional, tienen un lugar destacado para ser utilizado como aditivo alimenticio. A pesar de su valor promisorio, esta especie no han sido incorporada aun en prácticas de cultivo, ni se ha sometido a prácticas de domesticación y

comercialización de manera organizada. En este sentido, resulta necesario profundizar los estudios de propagación, domesticación y evaluación de otras actividades biológicas de los metabolitos secundarios, proteínas, péptidos y lípidos de las semillas de esta especie, ya que podrían ser utilizados para la industria alimenticia y farmacéutica. Un abordaje multidisciplinario e interinstitucional para desarrollar el cultivo, el manejo y aprovechamiento de berberis localmente abre la posibilidad de generar nuevas alternativas bioeconómicas para diversificar la matriz productiva territorial, teniendo en cuenta el uso sostenible de la biodiversidad regional.

Agradecimientos

Gracias a BIOALI-CYTED por su apoyo a la investigación científica.

Referencias bibliográficas

1. FAO. The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050 [Internet]. Roma; 2018 [cited 30 March 2020]. Available from: <http://www.fao.org/3/I8429EN/i8429en.pdf>
2. Khoury C, Bjorkman A, Dempewolf H, Ramirez-Villegas J, Guarino L, Jarvis A. Increasing homogeneity in global food supplies and the implications for food security. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(11):4001-6.
3. Dempewolf H, Eastwood R, Guarino L, Khoury C, Müller J, Toll J. Adapting Agriculture to Climate Change: A Global Initiative to Collect, Conserve, and Use Crop Wild Relatives. *Agroecology and Sustainable Food Systems*. 2014;38(4):369-377.
4. FSIN. Global report on food crises: joint analysis for better decisions. 1st ed. Rome (Italy) and Washington (DC): Food and Agriculture Organization (FAO), World Food Programme (WFP), and International Food Policy Research Institute; 2019.
5. Göbel C, Langen N, Blumenthal A, Teitscheid P, Ritter G. Cutting Food Waste through Cooperation along the Food Supply Chain. *Sustainability*. 2015;7(2):1429-1445.
6. FAO. Global food losses and food waste. Roma: FAO; 2011. Available from: <http://www.fao.org/3/mb060e/mb060e00.pdf>
7. ODS. Apoyo del PNUD para la implementación de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible PNUD [Internet]. UNDP. 2020 [cited 16 June 2020]. Available from: <https://www.undp.org/content/undp/es/home/librarypage/poverty-reduction/undp-support-to-the-implementation-of-the-2030-agenda.html>
8. GBS. Comunicado: Cumbre Global de Bioeconomía 2018. Berlin, Alemania: Global Bioeconomy Summit; 2018.
9. Bugge M, Hansen T, Klitkou A. What Is the Bioeconomy? A Review of the Literature. *Sustainability*. 2016;8(7):691.
10. Grossauer F, Stoeglehner G. Bioeconomy—Spatial Requirements for Sustainable Development. *Sustainability*. 2020;12(5):1877.
11. Pfau S, Hagens J, Dankbaar B, Smits A. Visions of Sustainability in Bioeconomy Research. *Sustainability*. 2014;6(3):1222-1249.
12. Artuso A. Bioprospecting, Benefit Sharing, and Biotechnological Capacity Building. *World Development*. 2002;30(8):1355-1368.
13. Aramendis RH, Rodríguez AG, Krieger Merico LF. Contribuciones a un gran impulso ambiental en América Latina y el Caribe: bioeconomía Santiago: CEPAL; 2018. Saeidnia S, Gohari A, Kurepaz-Mahmoodabadi M, Mokhber-Dezfuli N. Phytochemistry and Pharmacology of Berberis Species. *Pharmacognosy Reviews*. 2014;8(15):8.
14. Rounsaville TJ, Ranney TG. Ploidy Levels and Genome Sizes of Berberis L. and Mahonia Nutt. Species, Hybrids, and Cultivars. *HortScience*. 2010;45(7):1029-1033.
15. Ahrendt LWA. Berberis and Mahonia. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 1961;57(369):1-410.
16. Orsi MC. Sinopsis de las especies argentinas del género Berberis (Berberidaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 1976;17:127-149.
17. Bottini C, Bustos C, Bran DE. Arbustos de la Patagonia. Calafates y michay. *Presencia*. 1993;8:5-9.
18. Correa MN. Flora patagónica. *INTA*. 1984;8:330-340.
19. Código Alimentario Argentino [Internet]. Argentina.gob.ar. 2020 [cited 2020Jun16]. Available from: <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>
20. Arayne MS, Sultana N, Bahadur SS. The berberis story: Berberis vulgaris in therapeutics. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 20;83-92.
21. Arrillaga GD. Domesticación del calafate (Berberis buxifolia Lam.) para fines agroindustriales. Couhaique, Chile: INIA; 2001.
22. Afsharinasab M, Mohammad-Sadeghipour M, Hajizadeh MR, Khoshdel A, Mirzaiey V, Mahmoodi M. The effect of hydroalcoholic Berberis integerrima fruits extract on the lipid profile, antioxidant parameters and liver and kidney function tests in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020.
23. Akbar SHAHID. Berberis vulgaris L. (Berberidaceae). In: *HANDBOOK OF 200 MEDICINAL PLANTS a comprehensive review of their traditional medical uses and scientific justifications*. S.I.: SPRINGER NATURE; 2020. p. 429-437.
24. Arena ME, Postemsky PD, Curvetto NR. Changes in the phenolic compounds and antioxidant capacity of Berberis microphylla G. Forst. berries in relation to light intensity and fertilization. *Scientia Horticulturae*. 2017Apr14;218:63-71.
25. Bottini M, Greizerstein EJ, Aulicino MB, Poggio L. Relationships among Genome Size, Environmental Conditions and Geographical Distribution in Natural Populations of NW Patagonian Species of Berberis L. (Berberidaceae). *Annals of Botany*. 2000Sep1;86(3):565-573.
26. Alvarez María Alejandra. Patagonia. In: *Pharmacological Properties of Native Plants from Argentina*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 227-247.
27. Fredes C, Parada A, Salinas J, Robert P. Phytochemicals and Traditional Use of Two Southernmost Chilean Berry Fruits: Murta (Ugni molinae Turcz) and Calafate (Berberis buxifolia Lam.). *Foods*. 2020;9(1):54.
28. Schmeda-Hirschmann G, Jiménez-Aspee F, Theoduloz C, Ladio A. Patagonian berries as native food and medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 2019;241:111979.
29. Díaz-Forestier J, León-Lobos P, Marticorena A, Celis-Diez JL, Giovannini P. Native Useful Plants of Chile: A Review and Use Patterns. *Economic Botany*. 2019;73(1):112-126.
30. Bernal V, Novellino P, Gonzalez PN, Perez SI. Role of wild plant foods among late Holocene hunter-gatherers from Central and North Patagonia (South America): An approach from dental evidence. *American Journal of Physical Anthropology*. 2007;133(4):1047-1059.
31. Ladio AH. The maintenance of wild edible plant gathering in a Mapuche community of patagonia. *Economic Botany*. 2001;55(2):243-254.
32. Khan I, Najeebullah S, Ali M, Shinwari ZK. Phytopharmacological and ethnomedicinal uses of the Genus Berberis (Berberidaceae): A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2016;15(9):2047.
33. Ruiz A, Hermosín-Gutiérrez Isidro, Mardones C, Vergara C, Herlitz E, Vega M, et al. Polyphenols and Antioxidant Activity of Calafate (Berberis microphylla) Fruits and Other Native Berries from Southern Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(10):6081-9.
34. Mariangel E, Reyes-Díaz M, Lobos W, Bensch E, Schalchli H, Ibarra P. The antioxidant properties of calafate (Berberis microphylla) fruits from four different locations in southern Chile. *Ciencia e investigación agraria*. 2013;40(1):161-170.
35. Pino MT. Valorización de frutales nativos seleccionados por el PROCISUR para ingredientes y aditivos. In: *Protocolos estandarizados para la valorización de frutos nativos del PROCISUR frente a la creciente demanda por ingredientes y aditivos especializados (carotenoides, antocianinas y polifenoles)*. Montevideo, Uruguay: ICAA; 2018. p. 7-10.
36. Boeri P, Piñuel L, Dalzotto D, Monasterio R, Fontana A, Sharry S, et al. Argentine Patagonia barberry chemical composition and evaluation of its antioxidant capacity. *Journal of Food Biochemistry*. 2020.

37. Chamorro MF, Reiner G, Theoduloz C, Ladio A, Schmeda-Hirschmann G, Gómez-Alonso S, et al. Polyphenol Composition and (Bio)Activity of Berberis Species and Wild Strawberry from the Argentinean Patagonia. *Molecules*. 2019;24(18):3331.
38. Reyes-Farías M, Vasquez K, Ovalle-Marin A, Fuentes F, Parra C, Quitral V, et al. Chilean Native Fruit Extracts Inhibit Inflammation Linked to the Pathogenic Interaction Between Adipocytes and Macrophages. *Journal of Medicinal Food*. 2015;18(5):601–608.
39. Rodoni LM, Feuring V, Zaro MJ, Sozzi GO, Vicente AR, Arena ME. Ethylene responses and quality of antioxidant-rich stored barberry fruit (*Berberis microphylla*). *Scientia Horticulturae*. 2014;179:233–238.
40. Ruiz A, Mardones C, Vergara C, Hermosín-Gutiérrez I, Baer DV, Hinrichsen P, et al. Analysis of hydroxycinnamic acids derivatives in calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) berries by liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*. 2013;1281:38–45.
41. Ruiz A, Hermosín-Gutiérrez Isidro, Mardones C, Vergara C, Herlitz E, Vega M, et al. Polyphenols and Antioxidant Activity of Calafate (*Berberis microphylla*) Fruits and Other Native Berries from Southern Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(10):6081–9.
42. Soto-Covasich J, Reyes-Farías M, Torres R, Vasquez K, Duarte L, Quezada J, et al. A polyphenol-rich Calafate (*Berberis microphylla*) extract rescues glucose tolerance in mice fed with cafeteria diet. *Journal of Functional Foods*. 2020;67:103856.
43. Manosalva L, Mutis A, Urzúa A, Fajardo V, Quiroz A. Antibacterial Activity of Alkaloid Fractions from *Berberis microphylla* G. Forst and Study of Synergism with Ampicillin and Cephalothin. *Molecules*. 2016;21(1):76.
44. Manosalva, Loreto, Mutis, Ana, Díaz, Juan, Urzúa, Alejandro, Fajardo, Víctor, Quiroz, Andrés, Identification of isoquinoline alkaloids from *Berberis microphylla* by HPLC ESI-MS/MS. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* [Internet]. 2014;13(4):324- 335. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85631435002>
45. Galanakis CM. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*. 2012;26(2):68–87.
46. Galanakis CM. Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: A viewpoint of opportunities and challenges. *Food and Bioproducts Processing*. 2013;91(4):575–579.
47. Mine Y, Jiang B, Li-Chan E. Biologically active food proteins and peptides in health: an overview. In: *Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals*. Iowa, USA: Wiley-Blackwell; 2010. p. 5–11.
48. Elias RJ, Kellerby SS, Decker EA. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008;48(5):430–441.
49. Doria J. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos tropicales*. 2010;31(1).
50. Ruiz A, Zapata M, Sabando C, Bustamante L, Baer DV, Vergara C, et al. Flavonols, Alkaloids, and Antioxidant Capacity of Edible Wild *Berberis* Species from Patagonia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014;62(51):12407–12417.
51. Tillhon M, Ortiz LMG, Lombardi P, Scovassi AI. Berberine: New perspectives for old remedies. *Biochemical Pharmacology*. 2012;84(10):1260–1267.
52. Tavakoli A, Sahari MA, Barzegar M. Antioxidant activity of *Berberis integerrima* seed oil as a natural antioxidant on the oxidative stability of soybean oil. *International Journal of Food Properties*. 2017;20
53. Kaya M, Ravikumar P, Ilk S, Mujtaba M, Akyuz L, Labidi J, et al. Production and characterization of chitosan based edible films from *Berberis crataegina*'s fruit extract and seed oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2018;45:287–297.

Received: 24 diciembre 2020

Accepted: 20 enero 2021

NEWS AND VIEWS

Colección de cultivos microbianos CIBE (CCM-CIBE): Una colección para la investigación

Microbial Culture Collection from CIBE (CCM-CIBE): A collection for research

María Gabriela Maridueña-Zavala, Adela Quevedo, Karla Aguaguña, Lissette Serrano, Daynet Sosa [DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.32](https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.01.32)

Resumen: Los microorganismos han sido fuente de importantes innovaciones industriales y su preservación ha contribuido al desarrollo de investigaciones. Sin embargo, en el Ecuador son pocas las iniciativas que buscan conservar microorganismos con potencial biotecnológico. La Colección de cultivos microbianos CCM-CIBE busca proteger la biodiversidad del Ecuador y contribuir a su estudio a través de la identificación, la conservación y la distribución de microorganismos. En nuestra colección empleamos métodos de conservación a largo plazo como conservación en agua, conservación en aceite mineral, crioconservación y liofilización. Así mismo, la CCM-CIBE cuenta con capacidades para brindar servicios de tenencia de microorganismos y recibir depósitos públicos o privados, garantizados a través de controles de viabilidad y seguridad de las cepas, así como de la información relacionada con cada microorganismo. Actualmente la colección cuenta con hongos, levaduras y bacterias patógenos de cultivos agrícolas, controladores biológicos, microorganismos presentes en procesos de fermentación que buscan fomentar el estudio de nuestra biodiversidad y contribuir a la mejora de procesos del sector agrícola, industria farmacéutica y de alimentos.

Palabras clave: Conservación, Ecuador, bacterias, hongos, levaduras.

Abstract: Microorganisms have been a source of critical industrial innovations, and their preservation has contributed to the development of research worldwide. However, there are only a few initiatives that seek to preserve microorganisms with biotechnological potential in Ecuador. The collection of microbial cultures CCM-CIBE seeks to protect Ecuador's biodiversity and contribute to its study by identifying, conserving, and distributing microorganisms. In our collection, we employ long-term conservation methods such as preservation in water, preservation in mineral oil, cryopreservation, and lyophilization. Likewise, the CCM-CIBE can provide services for the storage of microorganisms and receive public or private microbial deposits, guaranteed through viability and security controls of the strains and the information related to each microorganism. The collection contains fungi, yeasts, and pathogenic bacteria from crops, biological controllers, microorganisms present in fermentation processes, all of which seek to promote the study of our micro biodiversity and contribute to the improvement of agricultural processes, pharmaceutical, and food industries.

Key words: Conservation, Ecuador, bacteria, fungi, yeasts.

Introducción

El estudio de los microorganismos como potenciales instrumentos para solucionar problemas actuales en diversas áreas ha ido incrementándose con el pasar de los años. En la actualidad, el uso de microorganismos benéficos ha permitido mejorar procesos industriales, farmacéuticos, agrícolas y mineros, muchos de los cuales buscan biotecnologías respetuosas con el medio ambiente¹. Temas como el biodescubrimiento y la bioprospección han permitido un acceso a la bioactividad existente en la naturaleza, y desarrollos tecnológicos como la metagenómica han permitido también la rápida identificación y estudio de microorganismos.

Los microorganismos de interés biotecnológico pueden ser conservados en centros especializados para su posterior uso. A nivel mundial la creación de colecciones de cultivos de microorganismos son considerados puntos clave para la conservación de la biodiversidad y han contribuido substancialmente con investigaciones científicas y desarrollos tecnológicos². Colecciones de microorganismos como la MCC-India³, la Red de Colecciones de Cultivos en Chile⁴, la Red de Colecciones de Cultivos de los Estados Unidos (USCCN)⁵, alrededor de 17 colecciones de cultivos en México⁶, la Colección de Microorganismos Coordinada en Bélgica BCCM (<http://bccm.belspo.be>), la Colección de cultivos del CABI en Holanda

(<https://www.cabi.org/Services/>, CBS (<http://www.westerdijk.institute.nl/collections/>), entre otras, conservan cepas de bacterias, hongos, arqueas y levaduras de más de 60 años de antigüedad, manteniendo sus características funcionales.

Sin embargo, en el Ecuador las iniciativas para conservar microorganismos provenientes de nuestros ambientes biodiversos son aún muy escasos. De ahí la importancia de potenciar la colección de cultivos microbianos CCM-CIBE y las actividades de biodescubrimiento que se realizan en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) y demás entidades del Ecuador para el fomento de la investigación basada en la caracterización de microorganismos con potencial biotecnológico⁷⁻⁹. La CCM-CIBE se estableció en la ESPOL en el 2017 con los siguientes objetivos:

- Conservar la microdiversidad aislada producto de colectas, muestreos, y demás actividades de investigación.
- Brindar servicios de aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos.
- Ofrecer servicios de depósito de microorganismos utilizando metodologías estandarizadas.
- Propiciar investigaciones sobre los usos o aplicaciones potenciales de los microorganismos conservados y sus productos.

Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Guayaquil, Ecuador.

*Autor de correspondencia: gmaridue@espol.edu.ec

Creación de una colección de utilidad biotecnológica: CCM-CIBE

En la última década, El Centro de Investigaciones Biotecnológicas-CIBE de la ESPOL, ha realizado investigaciones asociadas al control fitosanitario de plantaciones¹⁰⁻¹², a la identificación de agentes causante de enfermedades en cultivos^{13,14}, a la sensibilidad de microorganismos a productos químicos u orgánicos¹⁵⁻¹⁷, a la bioprospección de suelos antárticos^{18,19}, a la obtención de metabolitos secundarios como bioestimulantes o fertilizantes de origen natural^{20,21} entre otras actividades encaminadas a contribuir con el desarrollo de la agroindustria. Como resultado de estas actividades, se obtuvieron un gran número de aislados microbianos de interés biotecnológico. Así, la CCM-CIBE se estableció en el 2017 a fin de mantener las bacterias, arqueas¹², hongos y levaduras^{14,17,22-24} caracterizadas como parte de las investigaciones del CIBE (figura 1). Hasta la fecha, la CCM-CIBE ha logrado conservar mediante técnicas de corto y largo plazo alrededor de 1720 cepas de microorganismos, incluyendo 900 hongos, 700 bacterias y 120 levaduras colectados en distintas zonas del país (figura 2). El CCM-CIBE consta entre los centros de colecciones de Latinoamérica de la WFCC (World Federation of Culture Collection) http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/by_id/1151).

Además de la experiencia en la preservación, caracterización e identificación de microorganismos, la CCM-CIBE cuenta con un cuarto de conservación en frío, laboratorios de bioseguridad nivel 1 y 2, equipos de ultracongelación, equipos de liofilización y demás materiales para el control de la conservación.

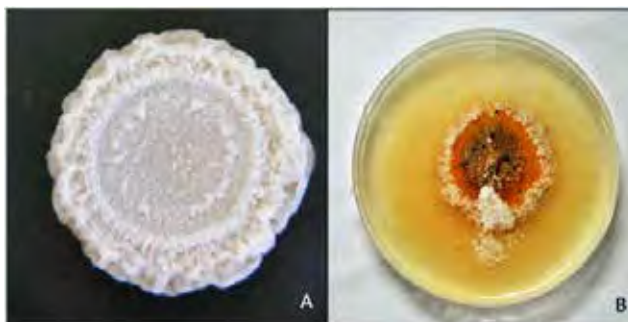


Figura 1. Colonias de microorganismos correspondientes a *Bacillus* sp. (A) y *Colletotrichum* sp. (B) que forman parte de la colección.

Identificación y caracterización de cepas microbianas

El CCM-CIBE fundamenta sus actividades de conservación en los "Lineamientos sobre buenas prácticas de biocustodia" y los "Guidelines for the Establishment and Operation of Collections of Cultures of Microorganisms" de la OECD²⁵. Así, la selección del método para la conservación se basa en el tipo de microorganismo, por lo que la identificación y caracterización de estos es el primer paso previo a su preservación. Para identificar un microorganismo, se toman en cuenta aspectos morfológicos como texturas, patrones de crecimiento, margen de las colonias, coloración del microorganismo²⁶, además de características bioquímicas, fisiológicas y particularidades sobre su crecimiento como nutrientes como fuentes de carbono y nitrógeno, etc²⁷. La identificación molecular se realiza mediante la extracción de ADN y técnicas de PCR (Polimerase chain reaction) utilizando primers específicos para posteriormente realizar una secuenciación Sanger en laboratorios especializados²⁸. La información obtenida nos ayuda a conocer los diferentes cambios que pueden sufrir los microorganismos en dependencia del método de conservación utilizado²⁹.

Conservación a largo plazo

Los métodos empleados por la CCM-CIBE se basan en el uso de aceite mineral, crioconservación, conservación en agua y liofilización (figura 3) con la finalidad de mantener la viabilidad, pureza, autenticidad y propiedades de los microorganismos durante todo el tiempo de conservación.

La conservación utilizando agua o aceite mineral se aplica generalmente a hongos. Para esto el micelio o conidios obtenidos a partir de cultivos puros, crecen en tubos con medio cultivo y una vez que se alcanza la esporulación del microorganismo se introduce aceite mineral, en el caso de conservación en agua esta técnica es ampliamente utilizada en hongos en la que secciones de micelio son conservados en tubos de 2ml con agua. Para ambos métodos los tubos se almacenan en cuartos fríos o a temperatura ambiente³⁰. Estas técnicas han permitido la conservación de hongos por periodos de 60 años o más.

La crioconservación y liofilización se aplica generalmente para bacterias y levaduras utilizando agentes crioprotectores como glicerol o proteínas lácteas, respectivamente^{31,32}.

La OECD también sugiere implementar medidas de bioseguridad y del aseguramiento de la colección para evitar fugas de microorganismos o contaminaciones que arriesguen la pureza de la colección. Por último, se recomienda utilizar protocolos estándares para la recuperación de las cepas y efectuar controles de calidad para los procedimientos. Así la CCM-CIBE, cuenta con instalaciones de nivel 2 de bioseguridad con acceso restringido y registros de entrada y salida de material biológico. Además, la viabilidad de los aislados conservados se verifica mediante cultivos en placa al menos una vez al año.

Depósito y base de datos

La CCM-CIBE recibe depósitos y realiza tenencia de microorganismos para terceros. El depósito y tenencia de microorganismos se puede realizar de forma pública o privada, dependiendo si el depositante desea o no mantener la confidencialidad de los microorganismos conservados (figura 4). Las actividades de depósito se identifican en tres fases como: recepción de la muestra, identificación de la muestra y depósito (conservación) de la muestra. Para ambos servicios se debe llenar los formularios en línea alojados en la página web del CIBE (www.cibe.espol.edu.ec), en el caso de un depósito se debe confirmar la autenticidad de la cepa previo a ser conservada y en el caso de solicitud de cepa se puede acceder al catálogo de microorganismos que posee información como la procedencia, cultivar y código asignado del CIBE. Los procedimientos de envíos, de reactivación del material microbiológico estarán disponibles en la web y en caso de requerir más información se puede comunicar al correo ccmcibe@espol.edu.ec.

Toda la información de los microorganismos será gestionada en la base de datos CIBEX que es una multiplataforma exclusivamente diseñada para la gestión de la CCM-CIBE, que nos permite generar alertas para tiempos de reactivación, de conservación, estadísticas de la colección que facilita su manejo.

Una vez realizado el depósito, la CCM-CIBE garantizará su viabilidad y el cumplimiento de las buenas normas de conservación de microorganismos.

Control de Calidad

Los controles de calidad son procedimientos que se llevan cabo a fin de mantener cepas viables, similar a la original y puras. La CCM-CIBE incorpora a su metodología controles de calidad, basados en los trabajos del Rol de Centro de colecciones³³, en tres puntos: Al recibir el material original, después de la preservación del primer lote de muestras, después de cada

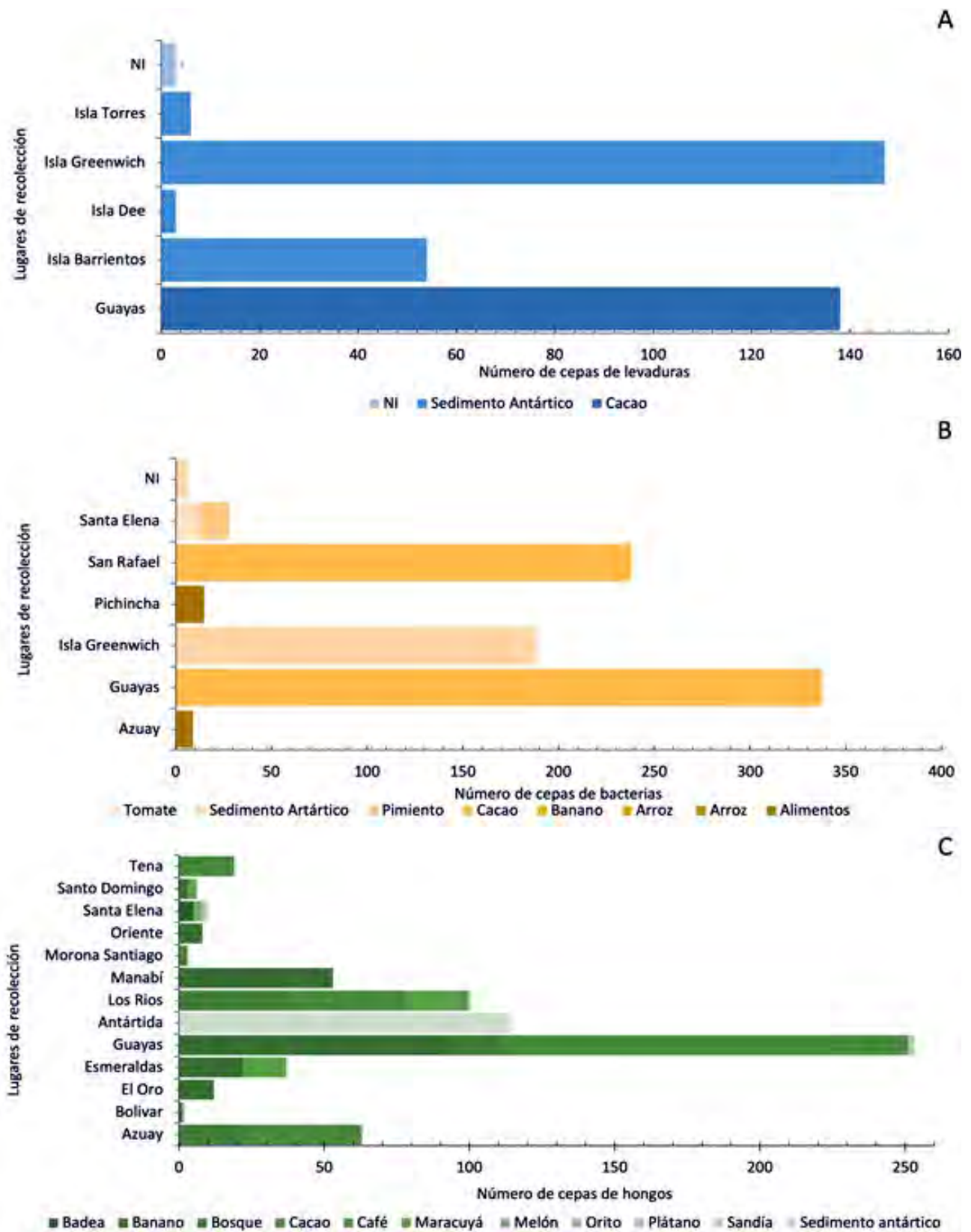


Figura 2. Colección de cultivos de levaduras (A) bacterias (B) y hongos (C) por cultivos y lugar de colecta.

nueva conservación subsecuente del lote. Para esto, se cultiva el microorganismo y se observa su pureza, así como también sus características a macro y microscópicas. Si es necesario se

verificará nuevamente la identidad de los aislados mediante la secuenciación de una región específica del ADN.



Figura 3. Colección de microorganismos conservados en aceite mineral (A) y Crioconservación (B).

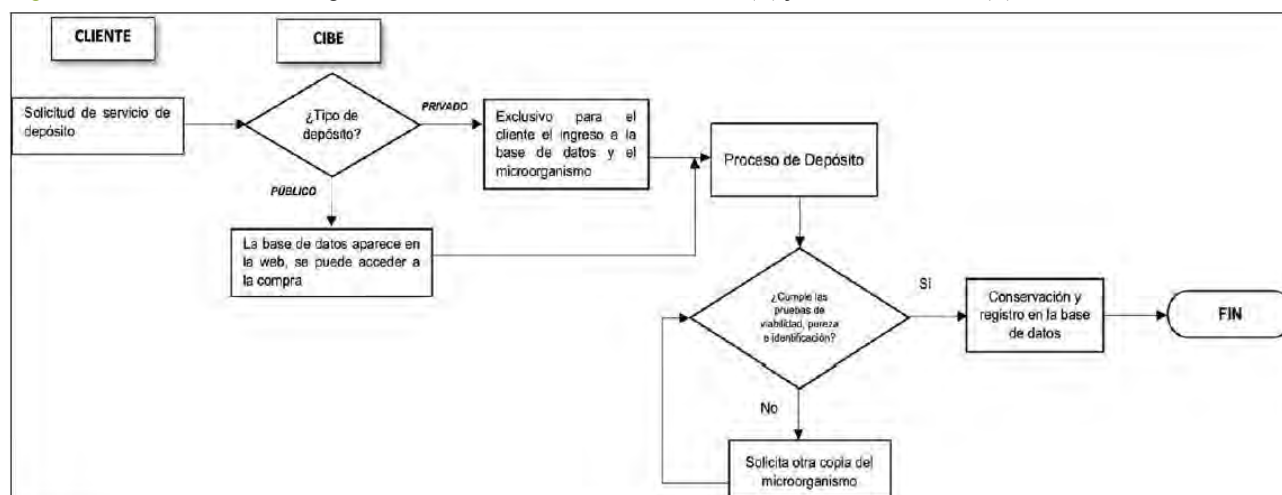


Figura 4. Flujo de depósito del material a conservar.

Conclusiones

Los más de 1700 aislados conservados en La CCM-CIBE representan una de las primeras iniciativas para la preservación de la diversidad microbiana en el Ecuador. El potencial biotecnológico de cada aislado debe aún ser evaluado a fin de identificar aplicaciones que beneficien a la sociedad.

Referencias bibliográficas

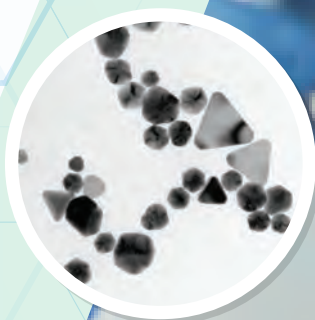
1. Reen FJ, Gutiérrez-Barranquero JA, O'Gara F. Mining Microbial Signals for Enhanced Biodiscovery of Secondary Metabolites. In: Humana Press, New York, NY; 2017:287-300. doi:10.1007/978-1-4939-6691-2_19
2. Oecd. OECD Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres. Vol 2.; 2007.
3. Bálint M, Schmidt PA, Sharma R, Thines M, Schmitt I. An Illumina metabarcoding pipeline for fungi. Ecol Evol. 2014. doi:10.1002/ece3.1107
4. Santos C, Durán P, Tortela G, et al. The Chilean Network of Microbial Culture Collections: Establishment and Operation. 2016;31(2):44-50. doi:10.22370/bolmicol.2016.32.2.
5. Boundy-Mills K, Hess M, Bennett AR, et al. The United States Culture Collection Network (USCCN): Enhancing microbial genomics research through living microbe culture collections. Appl Environ Microbiol. 2015;81(17):5671-5674. doi:10.1128/AEM.01176-15
6. Gutierrez-Jimenez, Javier; Luna- Cazáres, Lorena Mercedes; Mendoza-Orozco, Mónica Ivonne; Diaz-Marina, Jesús; Burguete-Gutierrez, Julio cesar; Feliciano- Guzman JM. Artículo original Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. Rev La Soc Venez Microbiol. 2015:95-102.
7. Sosa D, Quevedo A, Espinoza F, Pérez-martinez S, Malosso E, Castañeda-ruiz RF. *Coronosporidium ecuadorianum*. 2019;134(March):111-117.
8. Magdama F, Sosa D, Espinoza F, Serrano L, Malosso E. gen. nov., typified by. 2020;135(September):501-512.
9. Serrano L, Sosa D, Magdama F, et al. *Neomyrmecridium asymmetricum*. 2020;135(March):151-165.
10. Galarza L, Akagi Y, Takao K, Sun C. Characterization of *Trichoderma* species isolated in Ecuador and their antagonistic activities against phytopathogenic fungi from Ecuador and Japan. 2015:201-210. doi:10.1007/s10327-015-0587-x

11. Villavicencio-vásquez M, Espinoza-lozano RF, Pérez-martínez S, Del DS. biotecnología foliar endophyte fungi as candidate for bio-control against *Moniliophthora* spp. OF *Theobroma cacao* (Malvaceae) IN ECUADOR Hongos endófitos foliares como candidatos a biocontroladores contra *Moniliophthora* spp. de *Theobroma cacao* (Malvaceae). 035(3):235-241.
12. Cevallos-Cevallos JM, Gysel L, Maridueña-Zavala MG, Molina-Miranda MJ. Time-Related Changes in Volatile Compounds during Fermentation of Bulk and Fine-Flavor Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans. *J Food Qual.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/1758381
13. Magdama F, Monserrate-Maggi L, Serrano L, Sosa D, Geiser DM, Jiménez-Gasco M del M. Comparative analysis uncovers the limitations of current molecular detection methods for *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4 strains. *PLoS One.* 2019;14(9):e0222727. doi:10.1371/journal.pone.0222727
14. Maridueña-Zavala MG, Villavicencio-Vásquez ME, Cevallos-Cevallos JM, Peralta EL. Molecular and morphological characterization of *Moniliophthora roreri* isolates from cacao in Ecuador. *Can J Plant Pathol.* 2016;38(4). doi:10.1080/07060661.2016.1261372
15. Chávez, T., Chong, P., Ruiz, O., Peralta L. Análisis Genético de la Resistencia a Triazoles en Asilados de *Mycosphaerella fijiensis* para Poblaciones de Ecuador. 1973;4202.
16. Chong P, Platen HR Von. Diversidad Genética de Poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Provenientes de Haciendas Bananeras con Manejo Orgánico y Convencional Resumen. *Rev tecnológica ESPOL.* 2007;20(1):215-222.
17. Maridueña-Zavala MG, Freire-Peñaherrera A, Cevallos-Cevallos JM, Peralta EL. GC-MS metabolite profiling of *Phytophthora infestans* resistant to metalaxyl. *Eur J Plant Pathol.* 2017;1-12. doi:10.1007/s10658-017-1204-y
18. Calle P, Alvarado O, Monserrate L, Manuel J, Calle N, José J. Mercury accumulation in sediments and seabird feathers from the Antarctic Peninsula. *Mar Pollut Bull.* 2015;91(2):410-417. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.10.009
19. Yarzabal LA, Monserrate L, Buela L, Chica E. Antarctic *Pseudomonas* spp. promote wheat germination and growth at low temperatures. *Polar Biol.* 2018;41(11):2343-2354. doi:10.1007/s00300-018-2374-6
20. Manzano PI, Miranda M, Abreu-payrol J, Silva M, Sterner O. Pentacyclic triterpenoids with antimicrobial activity from the leaves of *Vernonanthura patens* (Asteraceae). 2013;25(7):539-543. doi:10.9755/ejfa.v25i7.15989
21. Chóez-Guaranda I, García J, Sánchez C, Pesantes C, Flores J, Manzano P. Identification of lupeol produced by *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. leaf callus culture. *Nat Prod Res.* 2019;0(0):1-5. doi:10.1080/14786419.2019.1636239
22. Gabriela Mariduena Zavala M, Ling Er H, Goss EM, Yi Wang N, Dewdney M, van Bruggen AH. Genetic variation among *Phyllosticta* strains isolated from citrus in Florida that are pathogenic or nonpathogenic to citrus. *Trop Plant Pathol.* 39(392):119-128. www.sbfito.com.br.
23. Maridueña G, Jiménez M, Peralta E. Actualización de la Micobiota Patogénica del Cacao " arriba " (*Theobroma cacao*) presente en la Costa Ecuatoriana. *Rev Tecnológica ESPOL – RTE.* 2010;23(1):21-26.
24. Sosa D, Galindo-Castro I, Diez N, Bernal C. Two-dimensional gel electrophoresis to identify arcelins from *Phaseolus vulgaris* with inmuno-proteomic analysis. *Agron Colomb.* 2019;36(2):114-119. doi:10.15446/agron.colomb.v36n2.67694
25. Smith D, Ryan M. Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms. *Sci World J.* 2012;2012. doi:10.1100/2012/805659
26. Khattab S, Abdel-Hadi A, Abo-Dahab N, Atta O. Isolation, Characterization, and Identification of Yeasts Associated with Foods from Assiut City, Egypt. *Br Microbiol Res J.* 2016;13(1):1-10. doi:10.9734/bmrj/2016/24170
27. Tsegaye Z, Gizaw B, Genene T. Isolation, Identification and Characterization of Yeast Species from Kocho and Bulla Collected from Gedeo Zone, South Nation Nationality People Regional States. 2016;2016:37-44.
28. Pietrowski GAM, Bittencourt JVM, Brandão LR, Rosa CA, Alberti A, Nogueira A. Identification and selection of non-Saccharomyces strains isolate from Brazilian apple must. *Cienc Rural.* 2018;48(5):18-21. doi:10.1590/0103-8478cr20170886
29. Desmeth P, Officer IC. World Federation for Culture Collections Guidelines for the Establishment and Operation of Collections of Cultures of. 2010:1-19.
30. de Capriles CH, Mata S, Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia.* 1989;106(2):73-79. doi:10.1007/BF00437084
31. Homolka L, Lisá L, Kubátová A, Váňová M, Janderová B, Nerud F. Cryopreservation of filamentous micromycetes and yeasts using perlite. *Folia Microbiol (Praha).* 2007;52(2):153-157. doi:10.1007/BF02932154
32. Singh SK, Baghela A. Cryopreservation of Microorganisms. *Mod Tools Tech to Understand Microbes.* 2017:321-333.
33. Janssens D, Arahal DR, Bizet C, Garay E. The role of public biological resource centers in providing a basic infrastructure for microbial research. *Res Microbiol.* 2010;161(6):422-429. doi:10.1016/j.resmic.2010.03.009

Received: 10 enero 2021

Accepted: 10 febrero 2021

La salud del futuro: Nanomedicina



**Aplicación de nanopartículas en
Medicina, Veterinaria, Cultivo Vegetal,
Agricultura y Acuicultura**



www.redinternacionaldebionanotecnologia.org  /Red-Internacional-de-Bionanotecnología

 <http://bionn.org/>  letyens@outlook.com  52-(646)-1366446

Docencia, investigación,
extensión y proyección
social al servicio del territorio



Fortalezas institucionales

- > Biotecnología
- > Limnología
- > Derechos Humanos – Posconflicto
- > Internacionalización
- > Inclusión Social
 - SER – Servicio Educativo Rural
 - Educación de Alfabetización
- > MII S – Instituto de formación para el trabajo y el desarrollo humano
- > Formación humanística “Ruta Humanística en el currículo - Cátedra abierta Maestra de la Sabiduría”
- > Investigación y desarrollo tecnológico
- > Comprometida con la calidad
- > Centro de Estudios Territoriales
- > Biodiversidad
 - Herbario
 - Ictiología
 - Fitoteca

Áreas del conocimiento

- Ciencias Agropecuarias
 - Ciencias de la Educación
 - Ciencias de la Salud
 - Ciencias Económicas y Administrativas
 - Ciencias Sociales
 - Derecho
 - Ingenierías
 - Teología y Humanidades
- > 26 programas de pregrado
- > 16 programas de posgrado
- 1 doctorado
 - 8 maestrías
 - 7 especializaciones

www.uco.edu.co  [Universidad Católica de Oriente](https://www.facebook.com/universidadcatolicadeoriente)  [@ucorrio](https://twitter.com/ucorrio)



“Servicio educativo con calidad en
Personas, procesos y servicios”

Contacto institucional Universidad Católica de Oriente
Sector 3, Cra. 46 No. 40B 50 - PBX: +(57)(4) 569 90 90. Ext. 604
Fax: +(57)(4) 501 09 72 - Email: uco@uco.edu.co

