



Universidad Francisco  
de Paula Santander  
Vigilada Mineducación



Sociedad Colombiana  
de Ciencias Hortícolas



Uptc  
Universidad Pedagógica y  
Tecnológica de Colombia

Revista Colombiana de Ciencias

# Hortícolas

Colombian Journal of Horticultural Science

Volumen 12 / No. 2 / mayo - agosto 2018

ISSN (impreso) 2011-2173 ISSN (electrónico) 2422-3719 / Doi: 10.17584/rcch



IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GENOMA DE TRES VIRUS EN LULO / EFECTO DE LAS DEFICIENCIAS Y EXCESOS DE FÓSFORO, POTASIO Y BORO EN AGUACATE / CORTE Y ENVASE EN LA CONSERVACIÓN DE LA PIÑA 'ORO MIEL' / SISTEMA INTEGRADO DE DIAGNÓSTICO Y RECOMENDACIÓN (DRIS) PARA PIÑA / ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA EN LA VID / SISTEMA DE COBERTURA DE MALLA EN PLANTAS DE UVA / EFECTO PARASÍTICO DE *TRICHOGRAMMA* Y DEL DEPREDADOR *CHRYSOPERLA* SOBRE HUEVOS DE *COMPSPUS* / EFFICACY OF NEONICOTINOID AND PYRETHROID INSECTICIDES IN *DIAPHORINA CITRI* / EFECTO DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS EN FRUTOS DE MANDARINA 'ARRAYANA' / CAROTENOIDES, CLOROFILAS Y PECTINAS EN LA MADURACIÓN DE GUAYABA / ASSOCIATED VIRUSES IN CAPE GOOSEBERRY, PURPLE PASSION FRUIT, AND ROSE / DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE MELÃO CANTALOUPE NO CERRADO BRASILEIRO / MICROPROPAGATION PROTOCOL FOR THE WILD BRAZILIAN GREENBERRY / PLANT GROWTH REGULATORS AND MINERAL NUTRIENTS ON TOMATO PLANTS / INTERACTION BETWEEN BIOLOGICAL AND CHEMISTRY FUNGICIDES AND TOMATO POLLINATORS / DETECCIÓN DE *FUSARIUM OXYSPORUM* EN PLANTAS ASINTOMÁTICAS DE TOMATE / ÁGUA TRATADA MAGNETICAMENTE NA CULTURA DA CENOURA / ACUMULACIÓN DE BIOMASA EN YUCA ANTE LA FERTILIZACIÓN NPK Y BIOFERTILIZANTES / COMPOSTAJE DE RESIDUOS ORGÁNICOS DOMICILIARIOS EN EL CRECIMIENTO DE LECHUGA / RICE HUSK SUBSTRATES AND PRUNING TIME FOR *CYPSOPHILA* PRODUCTION / FLORAL CAPITULA AND ESSENTIAL OIL PRODUCTION OF CHAMOMILE / PROPAGATION OF NATIVE BRAZILIAN *PIPER* SPECIES BY CUTTINGS AND IBA / INHIBIDORES DE ETILENO EN LA MADURACIÓN PRECOSECHA DEL FRUTO DE CAFÉ / LEAF AREA AND INTERMITTENT MISTING ON HOP PLANTS PROPAGATION BY STEM CUTTINGS / DEVELOPMENT AND ROOT MORPHOLOGY OF PASSION FRUIT IN DIFFERENT SUBSTRATES





Universidad Francisco  
de Paula Santander  
Vigilada Mineducación



Sociedad Colombiana  
de Ciencias Hortícolas



Uptc  
Universidad Pedagógica y  
Tecnológica de Colombia

Revista Colombiana de Ciencias

# Hortícolas

Colombian Journal of Horticultural Science

Volumen 12 / No. 2 / mayo-agosto 2018

**SOCIEDAD COLOMBIANA DE CIENCIAS HORTÍCOLAS – SCCH**

**UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA – UPTC**

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER – UFPS**

**EDITOR COMITÉ CIENTÍFICO**

Gerhard Fischer  
Universidad Nacional de Colombia  
(Bogotá)

Galdino Andrade Filho  
Universidade Estadual de Londrina (Brasil)

**COEDITOR**

Javier Álvarez-Herrera  
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (Tunja)

Michael Blanke  
Institute of Crop Science and Resource Conservation  
(Bonn, Alemania)

Marlon-Hans Rodríguez  
Universidad Francisco de Paula Santander (San José de Cúcuta)

Raúl Cabrera  
Texas A+M University  
(College Station, Estados Unidos)

**COMITÉ EDITORIAL**

Cassandro Amarante  
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC (Brasil)

Fávor Casierra-Posada  
Universidad Pedagógica y  
Tecnológica de Colombia (Tunja)

Juan Pablo Fernández  
Universidad Politécnica de Cartagena (Murcia, España)

Marcelo Francisco Pompelli  
Universidade Federal de Pernambuco  
(Recife, Brasil)

Christian Ulrichs  
Humboldt-Universität zu Berlin (Alemania)

Idupulapati Rao  
Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT  
(Cali, Colombia)

Hernán Mauricio Romero  
Universidad Nacional de Colombia (Bogotá)

Hermann Restrepo  
Universidad Nacional de Colombia (Bogotá)

Philip A. Stansly  
Universidad de Florida  
(Immokalee, Estados Unidos)

© 2018 Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas  
Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas  
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia  
Universidad Francisco de Paula Santander

ISSN (impreso): 2011-2173  
ISSN (electrónico): 2422-3719

#### INFORMACIÓN, CORRESPONDENCIA Y CANJE

Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Universidad Nacional de Colombia  
A.A. 14490, Bogotá, DC., Colombia  
Fax: (57) 1 - 316 5000 ext. 19041  
soccolhort@gmail.com

Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Tunja, Boyacá, Colombia  
Teléfono: (57) 8 - 742 2174/76  
Fax: (57) 8 - 742 4321  
rcch@uptc.edu.co

Universidad Francisco de Paula Santander  
Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente  
San José de Cúcuta, Norte de Santander, Colombia  
Teléfono: (57) 7 - 5776655  
ing.agronomica@ufps.edu.co

#### VERSIÓN ELECTRÓNICA

La revista puede consultarse en su versión electrónica  
en: [http://revistas.uptc.edu.co/revistas/index.php/ciencias\\_horticolas](http://revistas.uptc.edu.co/revistas/index.php/ciencias_horticolas)

Creative Commons: Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0  
Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)

#### PERIODICIDAD

Cuatrimestral

#### EDITORES

Gerhard Fischer (editor)  
Javier Álvarez-Herrera (coeditor)  
Marlon-Hans Rodríguez (coeditor)

#### CORRECTOR DE ESTILO EN INGLÉS

Christopher King

#### DISEÑO GRÁFICO Y ARMADA ELECTRÓNICA

Isabel Sandoval

#### IMPRESIÓN

Búhos Editores Ltda.  
Tunja, Colombia - agosto de 2018

La presente publicación es de carácter científico  
(artículo 4, Resolución 1508, Ministerio de Cultura, 3 de octubre de 2000).

A nivel internacional, la *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* está integrada en las bases de datos de Latindex, Google Académico, Family Farming Knowledge Platform (Plataforma de Conocimientos sobre Agricultura Familiar), Academic Search Ultimate (EBSCO), Red Iberoamericana de Innovación y Conocimiento Científico (REDIB), Ranking Rev-Sapiens, y en las siguientes de CAB Abstracts: AgBiotech News and Information, Agricultural Economics Database, Agroforestry Abstracts, Botanical Pesticides, Crop Physiology Abstracts, Crop Science Database, Environmental Science Database, Field Crop Abstracts, Forest Products Abstracts, Forestry Abstracts, Grasslands and Forage Abstracts, Horticultural Science Abstracts, Horticultural Science Database, Irrigation and Drainage Abstracts, Maize Abstracts, Nematological Abstracts, Ornamental Horticulture, Plant Breeding Abstracts, Plant Genetic Resources Abstracts, Plant Genetics and Breeding Database, Plant Growth Regulator Abstracts, Plant Protection Database, Postharvest News and Information, Potato Abstracts, Review of Agricultural Entomology, Review of Aromatic and Medicinal Plants, Review of Plant Pathology, Rice Abstracts, Rural Development Abstracts, Seed Abstracts, Soil Science Database, Soils and Fertilizers Abstracts, Sugar Industry Abstracts, TROPAG & RURAL, Weed Abstracts, Wheat, Barley and Triticale Abstracts, World Agricultural Economics and Rural Sociology Abstracts.

En Colombia se encuentra indexada en categoría B de Publindex (Colciencias) y en SciELO (Scientific Electronic Library Online). Además cuenta DOI (Digital Object Identifier) para la totalidad de sus artículos.

Revista colombiana de ciencias hortícolas = Colombian journal of horticultural science / Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia - Vol.1, No.1 (2007) - Tunja: SCCH: Uptc, 2007 - Semestral

ISSN 2011-2173

1. Horticultura - Publicaciones Seriadas. - 2. Agricultura - Publicaciones Seriadas. - 3. Uptc - Publicaciones Seriadas  
CDD 635

#### Publicación cofinanciada por la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UPTC y la Universidad Francisco de Paula Santander

Se autoriza la citación del material que aparece en la Revista, siempre y cuando se indique de manera explícita: nombre de la revista, nombre(s) del (de los) autor(es), año, volumen, número y páginas del artículo fuente. Para el permiso de reproducir parcial o totalmente los artículos de la Revista debe dirigirse al correo electrónico del editor: [gerfischer@gmail.com](mailto:gerfischer@gmail.com). Las ideas y observaciones consignadas por los autores están bajo su responsabilidad y no representan necesariamente las opiniones ni política de la Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia y la Universidad Francisco de Paula Santander. La mención de productos o firmas comerciales en la revista no implica recomendación o apoyo por parte de la Sociedad o las universidades; el uso de tales productos debe ceñirse a las recomendaciones de las etiquetas.



### **SOCIEDAD COLOMBIANA DE CIENCIAS HORTÍCOLAS (BOGOTÁ)**

Diego Miranda Lasprilla  
PRESIDENTE  
Universidad Nacional de Colombia

Wilson de Jesús Piedrahíta Cañola  
VICEPRESIDENTE  
Universidad Nacional de Colombia

Gerhard Fischer  
SECRETARIO EJECUTIVO  
Universidad Nacional de Colombia

Stanislav Magnitskiy  
VOCAL  
Universidad Nacional de Colombia

Carlos Edwin Carranza Gutiérrez  
TESORERO  
Universidad Nacional Abierta y a Distancia

Jorge Miranda Vallejo  
VOCAL  
Hm. Clause

Rafael Flórez Faura  
VOCAL  
Universidad del Tolima

Luis Carlos Leiva Cobos  
FISCAL  
Fruverandes Ltda.

Julián Fernando Cárdenas Hernández  
VOCAL  
Universidad de los Llanos

### **UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA (TUNJA)**

Alfonso López Díaz  
RECTOR

Hugo Alfonso Rojas Sarmiento  
VICERRECTOR ACADÉMICO

Enrique Vera López  
DIRECTOR DE INVESTIGACIONES

Martín Orlando Pulido Medellín  
DIRECTOR  
Centro de Gestión de Investigación y  
Extensión de la Facultad de Ciencias  
Agropecuarias – CIECA

Ana Cruz Morillo Coronado  
DECANA  
Facultad de Ciencias Agropecuarias

Luis Miguel Borrás Sandoval  
DIRECTOR  
Escuela de Posgrados  
Facultad de Ciencias Agropecuarias

Ángela Mireya Rodríguez Salgado  
DIRECTORA  
Escuela Medicina Veterinaria y Zootecnia

María Mercedes Melo Torres  
DIRECTORA  
Escuela Ingeniería Agronómica

Carlos Eduardo Villamil Vela  
ASESOR  
Facultad de Ciencias Agropecuarias

### **UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER (CÚCUTA)**

Héctor Miguel Parra López  
RECTOR

Sandra Ortega Sierra  
SECRETARIA GENERAL

Olga Marina Vega Angarita  
VICERRECTORA ACADÉMICA

Maribel Cárdenas García  
VICERRECTORA ADMINISTRATIVA

Luis Eduardo Trujillo Toscano  
VICERRECTOR BIENESTAR  
UNIVERSITARIO

Jhan Piero Rojas Suárez  
VICERRECTOR ASISTENTE  
DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN

Néstor Andrés Urbina Suárez  
DECANO  
Facultad de Ciencias Agrarias  
y del Ambiente

Camilo Ernesto Guerrero Alvarado  
DIRECTOR  
Departamento Ciencias Agrícolas  
y Pecuarias

Dora Clemencia Castillo Villada  
DIRECTORA  
Departamento Ciencias del Medio Ambiente



**Editorial** 279

---

**Sección de frutales**

---

- Identificación y caracterización molecular del genoma completo de tres virus en cultivos de lulo (*Solanum quitoense*) de Antioquia (Colombia)**  
Identification and molecular characterization of the complete genome of three viruses infecting lulo (*Solanum quitoense*) crops in Antioquia (Colombia)  
Yuliana Gallo, Luisa Fernanda Toro, Helena Jaramillo, Pablo Andrés Gutiérrez, Mauricio Marín..... 281
- Efecto de las deficiencias y excesos de fósforo, potasio y boro en la fisiología y el crecimiento de plantas de aguacate (*Persea americana*, cv. Hass)**  
Effect of deficiencies and excesses of phosphorus, potassium and boron on the physiology and growth of avocado (*Persea americana*, cv. Hass) plants  
María Alejandra Novoa, Diego Miranda, Luz Marina Melgarejo..... 293
- Efecto del tipo de corte y tipo de envase en la conservación de piña [*Ananas comosus* (L.) Merr.] 'Oro Miel' mínimamente procesada**  
Effect of cutting and packaging type on the conservation of fresh-cut 'Golden' pineapple fruit [*Ananas comosus* (L.) Merr.]  
Elkin Mauricio Buitrago-Dueñas, Saul Dussán-Sarria, María Camila Rivera-Ochoa, Luis Eduardo Ordoñez-Santos ..... 308
- Sistema Integrado de Diagnóstico y Recomendación (DRIS) para piña (*Ananas comosus*), variedad Oro Miel (MD-2)**  
Diagnosis and Recommendation Integrated System (DRIS) for pineapple (*Ananas comosus*), Honey Gold variety (MD-2)  
Jennífer López-Montoya, Jéssica Alejandra Fernández-Paz, Herney Darío Vásquez, Juan Carlos Menjivar-Flores ..... 319
- Estimación de la concentración de clorofila mediante métodos no destructivos en vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Riesling Becker**  
Chlorophyll concentration estimation using non-destructive methods in grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. Riesling Becker  
Cristian Santiago Castañeda, Pedro José Almanza-Merchán, Elberth Hernando Pinzón, Germán Eduardo Cely-Reyes, Pablo Antonio Serrano-Cely ..... 329
- Evaluación del uso de sistema de cobertura de malla en plantas de uva de mesa 'Thompson Seedless'**  
Evaluation of the use of a net coverage system in table grape vines, Thompson Seedless variety  
Manuel Salazar, Rodrigo Callejas, Luis Morales..... 338
- Efecto parasítico de *Trichogramma* y del depredador *Chrysoperla* sobre huevos de *Compsus viridivittatus*, plaga de *Vitis vinifera*, en laboratorio**  
Parasitism of *Trichogramma* and predation of *Chrysoperla* on *Compsus viridivittatus* eggs, a *Vitis vinifera* pest, under laboratory conditions  
Diego Alonso Pinzón-Hamón, John Wilson Martínez-Osorio, Mayerly Alejandra Castro-López ..... 348

<b>Evaluation of the efficacy of neonicotinoid and pyrethroid insecticides in <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) populations in Colombia</b> Evaluación de la eficacia de insecticidas neonicotinoides y piretroides sobre poblaciones de <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) en Colombia Augusto Ramírez-Godoy, Gina Puentes-Pérez, Hermann Restrepo-Díaz.....	358
<b>Comportamiento poscosecha de frutos de mandarina (<i>Citrus reticulata</i> Blanco) var. Arrayana: efecto de diferentes tratamientos térmicos</b> Postharvest behavior of mandarin fruits ( <i>Citrus reticulata</i> Blanco) var. Arrayana: effect of thermal treatments Helber Enrique Balaguera-López, Edgar Alfonso Palacios O.....	369
<b>Carotenoides, clorofilas y pectinas durante la maduración de variedades de guayaba (<i>Psidium guajava</i> L.) de Santander, Colombia</b> Carotenoids, chlorophylls and pectins during ripening of guava ( <i>Psidium guajava</i> L.) from Santander, Colombia Jacqueline Guavita-Vargas, Lizeth M. Avellaneda-Torres, María Elena Solarte, Luz Marina Melgarejo .....	379
<b>Preliminary evaluation of associated viruses in production systems of cape gooseberry, purple passion fruit, and rose</b> Evaluación preliminar de virus asociados a sistemas productivos de uchuva, gulupa y rosa Joseph Cutler, Juliane Langer, Susanne Von Bergen, Orlando Acosta-Losada, Fánor Casierra-Posada, Adriana Castañeda-Cárdenas, Mónica Betancourt-Vásquez, Wilmer Cuellar, Eduardo Arvydas-Stasiukynas, Denise Altenbach, Carmen Büttner .....	390
<b>Desenvolvimento e produção de melão Cantaloupe em função do espaçamento e ambientes de cultivo no Cerrado brasileiro</b> Development and production of Cantaloupe melon as a function of plant spacing and growing environments in the Brazilian Cerrado Eduardo Pradi Vendruscolo, Alexsander Seleguini, Luiz Fernandes Cardoso Campos, Aliny Heloísa Alcântara Rodrigues, Sebastião Ferreira de Lima .....	397
<b>Micropropagation protocol for the wild Brazilian greenberry (<i>Rubus erythroclados</i>)</b> Protocolo de micropropagación de mora-verde ( <i>Rubus erythroclados</i> ) nativa del Brasil Paulo Mauricio Centenaro Bueno, Luiz Antonio Biasi, Mauro Brasil Dias Tofaneli.....	405
<b>Sección de hortalizas</b>	
<b>Productive and qualitative performance of tomato plants as a function of the application of plant growth regulators and mineral nutrients</b> Desempeño productivo y cualitativo de plantas de tomate en relación con la aplicación de reguladores de crecimiento y nutrientes minerales Marília Caixeta Sousa, Luan Fernando Ormond Sobreira Rodrigues, Mônica Bartira da Silva, Janaina Oliveira Cruz, Marla Silvia Diamante, Bruno Novaes Menezes Martins, Lilian Massaro Simonetti, João Domingos Rodrigues.....	416
<b>Interaction between biological and chemistry fungicides and tomato pollinators</b> Interacción entre fungicidas biológicos y químicos con polinizadores de tomate Carlos de Melo e Silva-Neto, Anna Clara Chaves Ribeiro, Flaviana Lima Gomes, Jordana Guimarães Neves, Aniela Pilar Campos de Melo, Francine Neves Calil, Abadia dos Reis Nascimento, Edivani Villaron Franceschinelli .....	425
<b>Detección de plantas asintomáticas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. infectadas con <i>Fusarium oxysporum</i> usando espectroscopia de reflectancia VIS</b> Detection of asymptomatic <i>Solanum lycopersicum</i> L. plants infected with <i>Fusarium oxysporum</i> using reflectance VIS spectroscopy Juan Carlos Marín-Ortiz, Lilliana Maria Hoyos-Carvajal, Verónica Botero-Fernández.....	436



### Água tratada magneticamente para irrigação: efeitos na produção e eficiência do uso da água na cultura da cenoura (*Daucus carota* L.)

Magnetically treated water for irrigation: effects on production and efficiency of water use in carrot (*Daucus carota* L.) crop

Fernando Ferrari Putti, Luís Roberto Almeida Gabriel Filho, Camila Pires Cremasco, Josué Ferreira Silva Junior..... 447

### Acumulación de biomasa en yuca (*Manihot esculenta* C.) ante la respuesta a la aplicación de fertilizantes NPK y biofertilizantes en condiciones de invernadero en dos tipos de suelo

Biomass accumulation response of cassava (*Manihot esculenta* C.) to NPK fertilization and biofertilizers in two soil types under greenhouse conditions

Jazmín Vanessa Pérez-Pazos, Lily Lorena Luna-Castellanos, Oscar Burbano-Figueroa ..... 456

### Efecto del compost de residuos orgánicos domiciliarios, vegetales y estiércol en el crecimiento de lechuga

Effect of organic residue compost made from household waste, plant residues and manure on the growth of lettuce

Daianni Ariane da Costa Ferreira, Nildo da Silva Dias, Ana Kaline da Costa Ferreira, Cybelle Barbosa e Lima Vasconcelos, Francisco Souto de Sousa Junior, Vania Christina Nascimento Porto, Cleyton dos Santos Fernandes, Manuel Antonio Navarro Vásquez ..... 464

## Sección de plantas ornamentales

### Rice husk substrates and pruning time for gypsophila production

Sustratos de cascarilla de arroz y momento de la poda en la producción de gypsophila

Daniela Höhn, Roberta Marins Nogueira Peil, Lais Perin, Priscila Monalisa Marchi, Paulo Roberto Grolli, Albertina Radtke Wieth ..... 475

## Sección de plantas aromáticas, medicinales y condimentarias

### Floral capitula and essential oil production analysis of chamomile (*Chamomilla recutita*) cultivars at different times of harvest

Análisis de la producción de capítulos florales y aceite esencial de cultivares de manzanilla (*Chamomilla recutita*) en diferentes épocas de cosecha

Milton S. Matsushita, Cícero Deschamps, Cirino Corrêa Júnior, Marília P. Machado ..... 484

### Propagation of three native Brazilian *Piper* species by cuttings and indole butyric acid

Propagación de tres especies nativas brasileñas de *Piper* usando estacas y ácido indolbutírico

Aurea Portes Ferriani, Cícero Deschamps, Wanderlei do Amaral, Luiz Everson da Silva ..... 491

## Artículo de otras especies

### Efecto de cuatro inhibidores de etileno en la maduración del fruto de café (*Coffea arabica* L.) durante precosecha

Effects of four ethylene inhibitors on the ripening of coffee (*Coffea arabica* L.) fruits during the pre-harvest period

Carlos Andrés Unigarro, Claudia Patricia Flórez, Carlos Eugenio Oliveros, Myriam Cañón..... 500

### Leaf area and intermittent misting on hop plants propagation by stem cuttings

Área foliar y nebulización intermitente en la propagación de lúpulo por estacas de tallo

Erik Nunes Gomes, Marília Pereira Machado, José Miola, Cícero Deschamps ..... 508

## Nota científica

---

### Development and root morphology of passion fruit in different substrates

Desarrollo y morfología de la raíz del maracuyá en diferentes substratos

Karminne Dias do Valle, Laísse Danielle Pereira, Moab Acácio Barbosa, Vanessa Brenda Souza Chaves,

Pedro Henrique Magalhães de Souza, Edésio Fialho dos Reis, Alejandro Hurtado-Salazar, Danielle Fabíola Pereira da Silva..... 514

---

### Política editorial | Instrucciones para autores

521

---

### Editorial policy | Instructions to authors

525

---

### Política editorial | Instruções aos autores

530

---

### Suscripción

535

---

Por tercera vez consecutiva las entidades editoriales de la Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas (RCCH), - Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia y Universidad Francisco de Paula Santander -, presentan a los lectores un fascículo con 25 artículos dentro de la nueva periodicidad cuatrimestral, iniciada desde el 2018. Este y el último número del año (septiembre-diciembre), contendrán artículos en los tres idiomas (español, inglés y portugués), ya que a partir del próximo año la revista publicará solamente en inglés, para aumentar su visibilidad internacional y nivel académico. Por otro lado, debido a la gran cantidad de artículos que llegan de diferentes países, especialmente de Sur y Centro América, la RCCH dará prelación solamente a los artículos de las especialidades de frutales, hortalizas, ornamentales y hierbas aromáticas. Este segundo número del año, contiene artículos de países como Brasil, Chile, Alemania y Colombia, en los idiomas español (13), inglés (10) y portugués (2).

En el caso de la Sección de Frutales con la mayor cantidad de artículos (13), se abordan temas como la identificación y caracterización molecular del genoma completo de virus en lulo (*Solanum quitoense*), las deficiencias y excesos de P, K y B en plántulas de aguacate (*Persea americana*), dos trabajos en piña (*Ananas comosus*) buscan en primer lugar aumentar el tiempo en vitrina implementando el mínimo procesamiento con distintos tipos de corte y envase en la variedad Oro Miel y la segunda investigación realiza una validación del Sistema Integrado de Diagnóstico y Recomendación (DRIS) en la interpretación de los análisis foliares en los cultivos del Valle del Cauca.

Tenemos un aumento en los artículos del cultivo de vid (*Vitis vinifera*); dos de ellos provienen de la zona productora de Boyacá (Colombia) donde se evalúa los contenidos de clorofila mediante métodos no destructivos y la eficiencia del parasitoide *Trichogramma* junto con la del depredador *Chrysoperla* para el control de la plaga *Compsus viridivittatus*. Mientras en el Valle del Huasco (Chile), se buscan alternativas a las condiciones adversas del clima a través de una cobertura de mallas para la variedad Thompson Seedless.

En cítricos, se evalúa en un primer artículo, la eficacia de insecticidas neonicotinoides y piretroides sobre poblaciones de *Diaphorina citri*, mientras que en mandarina (*Citrus reticulata*) se aplican tratamientos térmicos para prolongar la vida útil del fruto. De igual forma, en guayaba (*Psidium guyava*) se caracterizaron los carotenoides, clorofilas y pectinas durante la maduración de diferentes cultivares de Santander (Colombia), y en los sistemas de producción colombianos de uchuva (*Physalis peruviana*), gulupa (*Pasiflora edulis*) y rosa (*Rosa* sp.) se realiza una evaluación preliminar de virus asociados a estos sistemas productivos. En caso de los sistemas productivos brasileros, se adelantaron evaluaciones sobre las distancias de siembra y condiciones ambientales de melón (*Cucumis melo*) 'Cantaloupe' y la descripción de un protocolo de micropropagación para cultivares nativos de mora-verde (*Rubus erythrocylados*).

Seis artículos se incluyeron en la Sección de Hortalizas con mayor prevalencia en el cultivo de tomate de mesa (*Solanum lycopersicum*), que por ejemplo procuraron maximizar el desempeño productivo y la calidad del fruto a través de reguladores de crecimiento y nutrientes; la combinación y compatibilidad entre fungicidas químicos y biológicos

con polinizadores; y la detección temprana o asintomática de *Fusarium oxysporum* con reflectancia en la hoja. Para el cultivo de zanahoria (*Daucus carota*), se estudia el efecto del agua magnetizada sobre la producción, entre tanto, en yuca (*Manihot esculenta*) se proyectan planes de fertilización convencional junto con biofertilizantes en diferentes suelos, y finaliza la sección con el potencial del compost de residuos orgánicos domiciliarios en la producción urbana de lechuga (*Lactuca sativa*).

En la Sección de Plantas Ornamentales se presenta el estudio de los sustratos de cascarilla de arroz y la poda en la producción de *Gypsophila paniculata* en sistemas de recirculación de agua. Dentro de la Sección de Plantas Aromáticas, Medicinales y Condimentarias, se analiza la producción de capítulos florales y rendimiento de aceite esencial en manzanilla (*Chamomilla recutita*) y la propagación por estacas de especies nativas brasileras de *Piper* usando ácido indolbutírico.

La Sección de Otras Especies describe el efecto de inhibidores de etileno en la maduración del fruto de café (*Coffea arabica*) y un segundo trabajo la formación del área foliar en la propagación de estacas de lúpulo (*Humulus lupulus*) bajo nebulización intermitente. Finalmente, una Nota Científica presenta el desarrollo y morfología de raíces de maracuyá en diferentes sustratos.

La amplia gama de temas del presente número en las áreas de horticultura y especies afines, responden al interés de nuestros lectores que provienen en su mayoría de Sur y Centroamérica. Como siempre, estamos apoyando a que nuevos investigadores logren publicar sus hallazgos, con el fin de trabajar en conjunto en el desarrollo de la horticultura en el trópico.

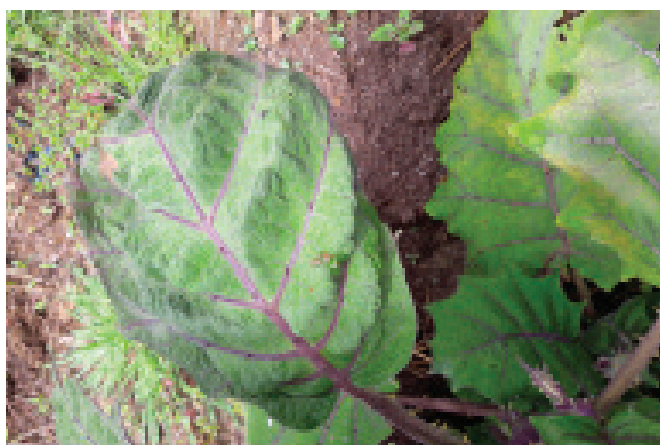
**Gerhard Fischer**

Editor en Jefe



# Identificación y caracterización molecular del genoma completo de tres virus en cultivos de lulo (*Solanum quitoense*) de Antioquia (Colombia)

Identification and molecular characterization of the complete genome of three viruses infecting lulo (*Solanum quitoense*) crops in Antioquia (Colombia)



YULIANA GALLO<sup>1, 2</sup>  
LUISA FERNANDA TORO<sup>2</sup>  
HELENA JARAMILLO<sup>2</sup>  
PABLO ANDRÉS GUTIÉRREZ<sup>2</sup>  
MAURICIO MARÍN<sup>3, 4</sup>

**Planta de lulo con síntomas de mosaico rugoso.**

Foto: M. Marín

## RESUMEN

El lulo es uno de los renglones agrícolas más promisorios para la región andina de Colombia, gracias a sus excelentes características organolépticas y a su potencial para el procesamiento industrial. En Antioquia, se ha observado en los últimos años la presencia de plantas con síntomas de enfermedades virales, que incluyen amarillamientos intervenales, mosaicos y deformación de brotes. En este trabajo, se evaluó dicha situación en un grupo (*bulk*) de muestras foliares de plantas sintomáticas de lulo obtenidas en municipios del Oriente Antioqueño, utilizando la metodología molecular de secuenciación de nueva generación (NGS), y la confirmación posterior por RT-PCR. Los análisis bioinformáticos de las secuencias obtenidas (10.777.822 de *reads*) indicaron la presencia de tres virus de RNA en el transcriptoma evaluado; el *Cucumber mosaic virus* (CMV) se encontró en mayores niveles de infección (40,4% del total de *reads*), mientras que los otros virus correspondieron al *Potato yellow vein virus* (PYVV) (0,09%) y *Alstroemeria necrotic streak virus* (ANSV) (0,06%), siendo posible obtener sus genomas completos. La ocurrencia de los tres virus fue confirmada en plantas individuales de lulo mediante pruebas de RT-PCR/secuenciación Sanger con cebadores específicos diseñados a partir de los datos de NGS (ANSV y CMV), o con cebadores reportados previamente (PYVV). En el futuro será necesario evaluar

<sup>1</sup> Facultad de Medicina, Universidad CES, Medellín (Colombia). ORCID Gallo, Y.: 0000-0002-6018-453X

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias, Laboratorio de Microbiología Industrial, Universidad Nacional de Colombia, Medellín (Colombia). ORCID Toro, L.F.: 0000-0002-3462-4087; ORCID Jaramillo, H.: 0000-0001-5613-5121; ORCID Gutiérrez, P.: 0000-0002-7003-6485

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias, Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Universidad Nacional de Colombia, Medellín (Colombia). ORCID Marín, M.: 0000-0001-7123-2747

<sup>4</sup> Autor para correspondencia. [mamarinm@unal.edu.co](mailto:mamarinm@unal.edu.co)

los efectos de estos virus sobre los rendimientos, longevidad de plantas y calidad de semilla en los cultivos de lulo en el país, así como sus métodos de transmisión, rango de hospedantes y sintomatología específica.

**Palabras clave adicionales:** *Crinivirus*, *Cucumovirus*, RT-PCR, secuenciación de nueva generación, *Tospovirus*.

## ABSTRACT

Lulo is one the most promising crops in the Andean region of Colombia because of its unique organoleptic properties and potential for industrial processing. In Antioquia, there has been a marked increase of lulo plants exhibiting typical symptoms of viral diseases, such as interveinal yellowing, mosaics and sprout deformation. In this research, we studied the presence of viruses infecting lulo in bulked leaf samples from Eastern Antioquia. Viruses were detected using Next-generation sequencing (NGS), with confirmation by RT-PCR. The NGS resulted in a total of 10'777,822 paired-end reads, of which 40.4% corresponded to *Cucumber mosaic virus* (CMV), 0.09% to *Potato yellow vein virus* (PYVV) and 0.06% to *Alstroemeria necrotic streak virus* (ANSV). Complete genome sequences were obtained for each of these viruses. RT-PCR primers for CMV and ANSV detection were designed using the assembled genomes reported in this study. Future research should investigate the effect of these viruses on crop yield, plant longevity and seed quality as well as their means of transmission, host range and specific symptoms.

**Additional key words:** *Crinivirus*, *Cucumovirus*, RT-PCR, next-generation sequencing, *Tospovirus*.

Fecha de recepción: 01-02-2018 Aprobado para publicación: 30-05-2018

## INTRODUCCIÓN

El lulo o naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.), es un frutal de la familia Solanaceae de origen andino, cultivado principalmente en Ecuador y Colombia en sistemas de producción campesinos (<1,2 ha). Sus frutos se caracterizan por sus excelentes características organolépticas, un alto contenido nutricional como fuente importante de vitamina C, hierro, calcio y fósforo y gran potencial para su procesamiento industrial en la fabricación de jugos, helados, néctares y pulpas congeladas (Franco *et al.*, 2002; Cardona *et al.*, 2016). En Ecuador se cultivan cerca de 10.000 ha, principalmente con materiales híbridos derivados de cruces entre *S. sessiliflorum* × *S. quitoense*, mientras que en Colombia para el año 2015, se registraron unas 8.600 ha, principalmente con las variedades Lulo de Castilla var. *septentrionale* (con espinas) y var. *quitoense* (sin espinas), además del híbrido La Selva (*S. hirtum* × *S. quitoense*) (Cámara de Comercio de Bogotá, 2015; Agronet, 2018). Los departamentos de Huila (1.853 ha), Valle del Cauca (1.055 ha), Tolima (988 ha) y Antioquia (620 ha) son los principales productores de este frutal en Colombia, y aunque el rendimiento promedio nacional se estima en 9,63 t ha<sup>-1</sup>, existen grandes

diferencias entre dichas regiones, pues en Antioquia se alcanzan 12,37 t ha<sup>-1</sup>, mientras que en Huila este valor es tan sólo de 6,69 t ha<sup>-1</sup>; lo que dista mucho de los rendimientos óptimos estimados para este frutal (17 t ha<sup>-1</sup>) (Franco *et al.*, 2002).

Diferentes factores relacionados con la selección adecuada de las zonas de siembra, calidad de las semillas, prácticas agrícolas (ej. podas, fertilización) y condiciones de la cosecha inciden en los bajos rendimientos alcanzados en este cultivo en Colombia (Ardila *et al.*, 2015; Cámara de Comercio de Bogotá, 2015; Cardona *et al.*, 2016). Adicionalmente, el lulo se ve afectado por diferentes plagas y enfermedades, siendo el gusano perforador del fruto (*Neoleucinodes elegantalis*) y el barrenador del tallo (*Faustinus* sp.) dos de los insectos más limitantes; mientras que la gota (*Phytophthora infestans*), la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y la fusariosis (*Fusarium oxysporum*) son las enfermedades micóticas más importantes; así como lo son la marchitez bacterial (*Ralstonia solanacearum*), los nemátodos agalladores (*Meloidogyne* spp.) y el virus de la hoja pequeña, que inicialmente

se registró en Antioquia en 1986, y que en la actualidad se considera endémico para todas las zonas productoras de Colombia (Tamayo *et al.*, 2003; Cámara de Comercio de Bogotá, 2015). Desafortunadamente, la etiología de esta enfermedad viral no se ha confirmado aún, aunque estudios preliminares sugieren su afinidad serológica con el *Potato leafroll virus* (PLRV), un polerovirus que afecta drásticamente cultivos de papa en todo el mundo (Tamayo *et al.*, 2003; Marín y Gutiérrez, 2016). Además de esta enfermedad, en cultivos de lulo de Colombia se ha registrado otra de posible origen viral denominada como “Amarillamiento de la hoja u hoja en forma de abanico” (Zuluaga, 1996); aunque nuevamente, su etiología específica se desconoce, siendo inicialmente descartado por Vaca *et al.* (1999) que fuera causada por un potyvirus.

En el mundo sólo se ha confirmado plenamente la infección de una especie viral en plantas de lulo bajo condiciones naturales, registro que se realizó recientemente en la provincia de Pastaza en Ecuador, sobre plantas con síntomas de mosaicos y manchas cloróticas del híbrido “Puyo”, y que corresponde a un nuevo tymovirus cuyo nombre tentativo es Naranjilla chlorotic mosaic virus (NarCMV) (Green *et al.*, 2018); mientras que utilizando inoculaciones bajo condiciones de invernadero, se identificaron reacciones de hipersensibilidad de *S. quitoense* ante el *Tobacco necrosis virus* (TNV) y de lesiones locales cloróticas/necróticas y mosaicos sistémicos al *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Potato aucuba mosaic virus* (PAMV), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY) y *Tobacco rattle virus* (TRV) (Horvath, 1987); estos virus también se reportan afectando diferentes plantas solanáceas (King *et al.*, 2012; Marín y Gutiérrez, 2016).

Recientemente, en un estudio de reconocimiento de enfermedades virales en cultivos de plantas solanáceas del Oriente de Antioquia (Colombia), se encontraron plantas con una sintomatología mixta asociada a virosis, que incluía mosaicos, moteados, amarillamientos intervenales y deformación de brotes. Ante las evidentes deficiencias de información que actualmente se tiene sobre los agentes causales de virosis en este cultivo, se decidió realizar el presente estudio, tendiente a identificar las especies de virus presentes en dichos tejidos sintomáticos, utilizando la metodología molecular de secuenciación de nueva generación (NGS) y la posterior confirmación de los virus detectados mediante pruebas de RT-PCR con cebadores específicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

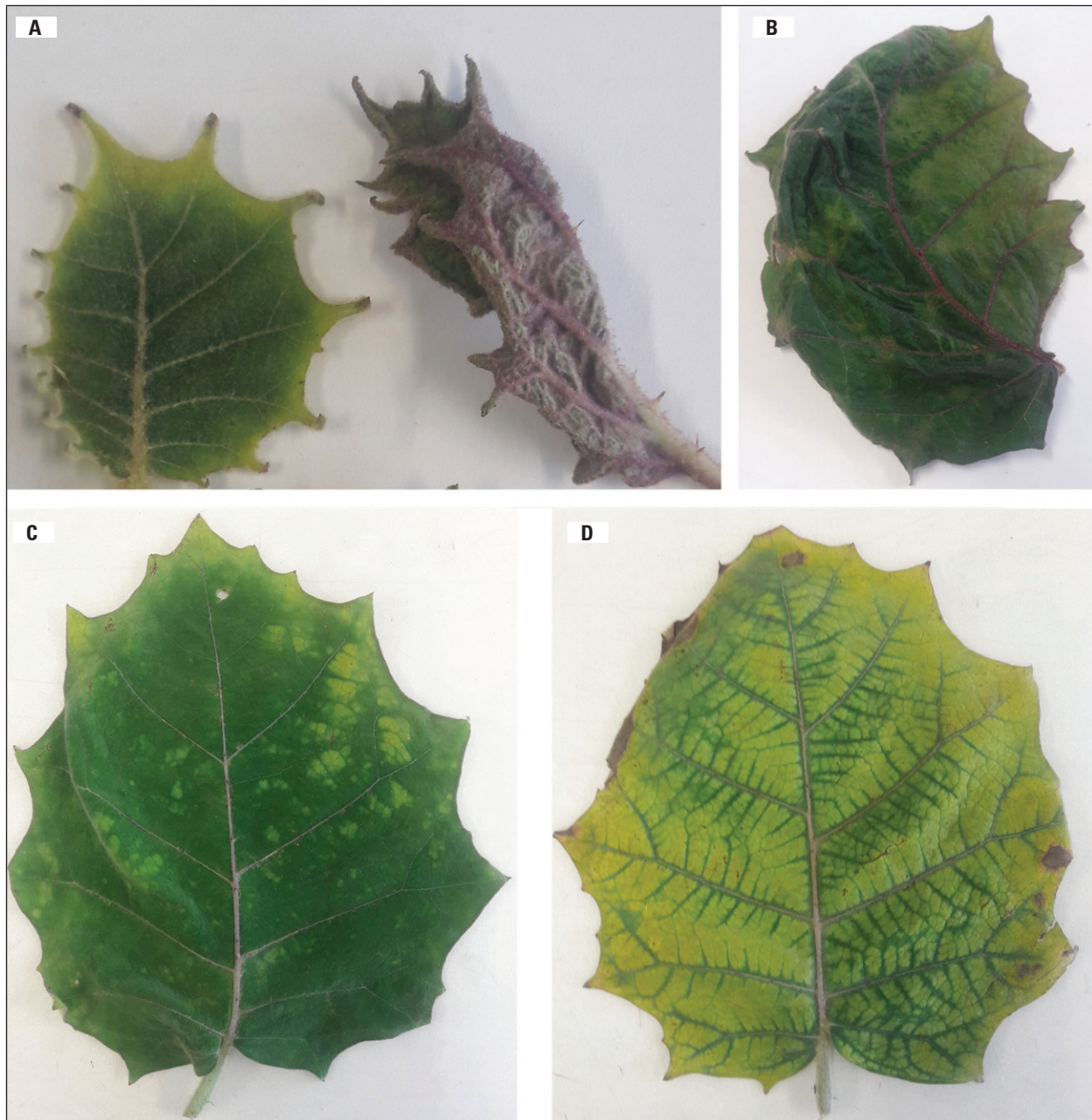
### Material vegetal

Durante los meses de Abril a Junio de 2017, se realizaron recorridos de reconocimiento de enfermedades virales en cultivos de lulo de los municipios de Marinilla (2 lotes), Sonsón (2 lotes) y San Vicente Ferrer (2 lotes), ubicados en el Oriente de Antioquia. En los dos lotes de Marinilla y San Vicente Ferrer y en un lote de Sonsón, se evidenciaron plantas con síntomas posiblemente asociados a infecciones virales (ej. mosaicos, moteados, amarillamientos intervenales y deformación de brotes) (Fig. 1), seleccionándose dos plantas de cada lote para la extracción de ácidos nucleicos en el laboratorio.

### Secuenciación de nueva generación (NGS)

A cada una de las 10 muestras sintomáticas obtenidas, se les realizó la extracción del RNA total utilizando el método del Trizol (Ambion, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), previa maceración con nitrógeno líquido, y se evaluó la concentración de RNA y su pureza con lecturas a 260 y 280 nm en Nanodrop 2000C (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Posteriormente, se realizó una mezcla (*bulk*) de 10  $\mu$ L de RNA de cada muestra, para ser utilizada como base del NGS, utilizando el sistema Illumina HiSeq-2500 (Macrogen, Seúl, Corea del Sur), previa degradación del RNA ribosomal con el tratamiento Ribo-Zero Plant (Illumina, San Diego, CA, USA) y la construcción de la librería de cDNA con el kit TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Una vez obtenidas las secuencias, se procedió a la remoción de los adaptadores y de las bases de baja calidad (*Phred* <30) utilizando el software Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) y al ensamblaje de *contigs* mediante Trinity (Grabherr *et al.*, 2011). Los *contigs* asociados a genomas virales fueron identificados mediante BLASTN y BLASTX (Gish y States, 1993). Las secuencias de los genomas virales fueron confirmadas por mapeo con respecto a genomas de referencia utilizando el programa BWA (Li y Durbin, 2009) y los marcos abiertos de lectura (ORF) fueron identificados por comparación con GenBank usando BLASTX (Gish y States, 1993). Los análisis filogenéticos con las secuencias obtenidas de los genomas virales, se realizaron con el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016), utilizando el método de máxima





**Figura 1. Síntomas observados de virus en plantas de lulo en el Oriente de Antioquia. A. Deformación de brotes; B. Mosaico y deformación de tejido foliar; C. Moteados foliares; D. Amarillamiento intervenal.**

verosimilitud con el modelo general de tiempo reversible y 1000 réplicas de *bootstrap* (Nei y Kumar, 2000).

### Confirmación viral por RT-PCR

Una vez identificados mediante NGS, los virus presentes en las muestras sintomáticas de lulo, se procedió a su confirmación en las 10 plantas individuales

mediante pruebas de RT-PCR con cebadores específicos diseñados en este trabajo a partir de las secuencias de los genomas completos de CMV (CMV1RP\_F: CGTCCACTGACATGATTGTTACC y CMV1RP\_R: CTCCACGACTGACCATTTTAGC) y ANSV (Tospo\_S\_F: CAGAATCAGGCTGCATTTAATTTCC y Tospo\_S\_R: CAACGCTTCCTTTAGCATTAGG) con ayuda del software Primer-3 (Untergasser *et al.*,



2012); así como con los cebadores reportados por Álvarez (2016) para PYVV (PYVV\_F\_CP: TCAGGTTAGAGCAGACAGAGG y PYVV\_R\_CP: AGTTCCTGCATTCTTGAACAGG). Para esto, se realizó la síntesis del DNA complementario (cDNA) de primera cadena utilizando 100 pmol de cada cebador reverso, 200 U de la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1X de buffer RT, 0,5 mM de los cuatro dNTPs, 20 U de inhibidor de RNAsas (RiboLock, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y de 100 a 500 ng de RNA. Las reacciones se incubaron a 42°C por 60 min y finalmente la enzima se desactivó a 70°C por 10 min. De esta forma, 50-100 ng del cDNA fueron utilizados para las reacciones de PCR en un volumen total de 25 µL, que contenían 1 U de la enzima Taq DNA polymerase (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1X de buffer, 1,8 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de los cuatro dNTPs, 0,2 µM de los cebadores específicos para cada virus, y 1 µL de albumina de suero bovino (10 mg mL<sup>-1</sup>). La amplificación se realizó en un termociclador T3 (Biometra, Goettingen, Alemania) y consistió de una desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguido por 40 ciclos de: 94°C (30 s), 52°C (1 min) y 72°C (1 min); y una extensión final por 5 min a 72°C. La presencia de amplicones se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1,8% y tinción con GelRed 1X (Biotium, Fremont, CA, USA), utilizando un visualizador de luz ultravioleta Bio Doc Analyze transilluminator (Biometra, Goettingen, Alemania). Finalmente, al menos tres de los amplicones del tamaño esperado fueron purificados del gel utilizando el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y su naturaleza viral fue confirmada por secuenciación Sanger en ambas direcciones en un equipo ABI Prism 3730xl sequencer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de la compañía Macrogen (Seúl, Corea del Sur).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

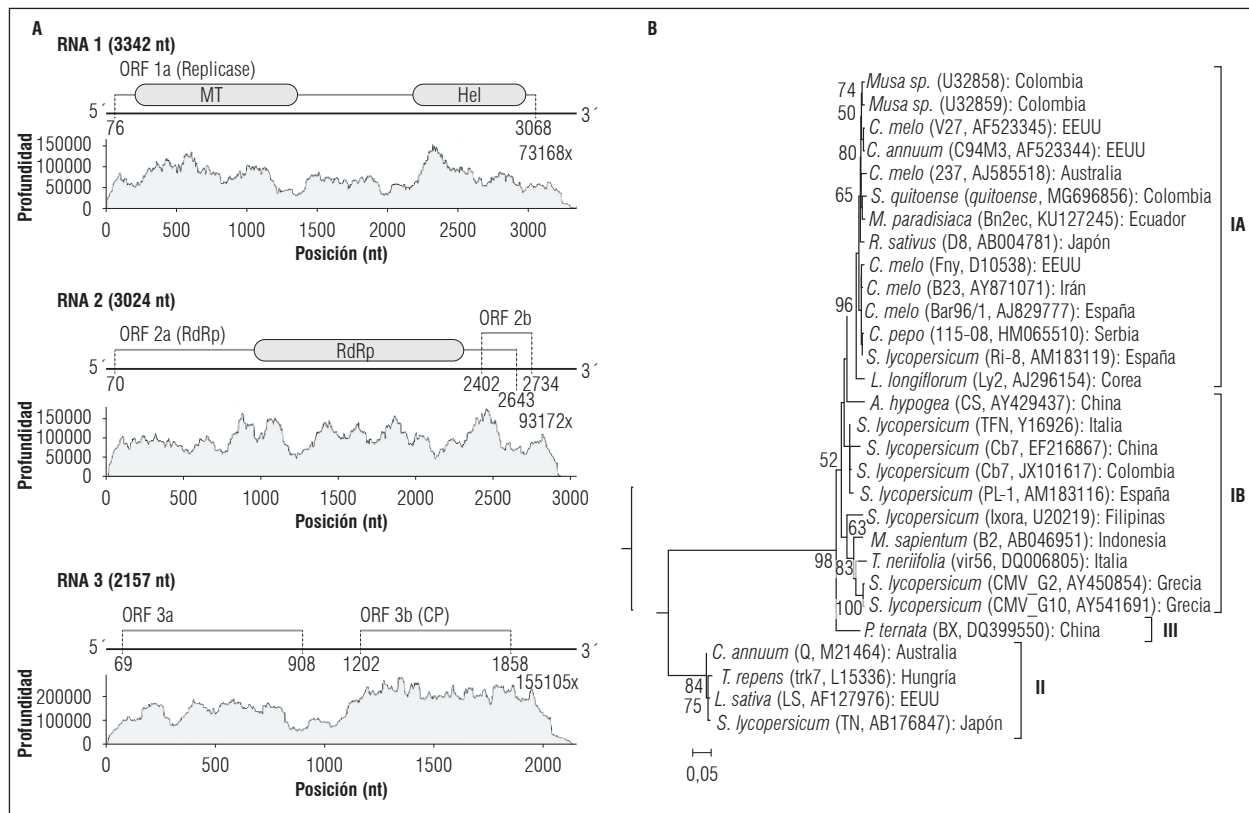
### Secuenciación de nueva generación

En el NGS se obtuvieron 10.777.822 *reads* de 101 nt, siendo posible identificar mediante análisis bioinformáticos un 58,54% de los *reads* (6.309.549) como correspondientes a diferentes tipos de RNA vegetal (ej. mensajero, ribosomal, no codificante, etc.) de origen nuclear (32,24%) y citoplasmático (3,14% mitocondrial y 23,16% cloroplástico), especialmente derivados de secuencias de plantas de la familia Solanaceae.

Adicionalmente, se encontró una baja cantidad de transcritos asociados a insectos (ej. áfidos, moscas blancas, trips), bacterias (ej. *Niastella* spp., *Methylobacterium* spp.) y hongos (ej. *Colletotrichum* spp., *Bipolaris* spp.). De estos *reads*, 4.356.916, equivalentes al 40,4% del total obtenido, correspondieron a secuencias de origen viral, lo que confirma que la sintomatología observada en los cultivos de lulo efectivamente estaba asociada a muy altos niveles de infección viral. Al realizar los ensamblajes en *contigs*, se lograron obtener los genomas completos de los virus de RNA: *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potato yellow vein virus* (PYVV) y *Alstroemeria necrotic streak virus* (ANSV).

### *Cucumber mosaic virus* (Bromoviridae)

Los *reads* derivados del genoma del CMV fueron mayoritarios en el transcriptoma bajo análisis, al representar el 99,6% (4.340.953) de los *reads* virales, siendo posible ensamblar su genoma completo de 8.523 nt, distribuidos en tres segmentos de RNA de cadena sencilla positiva y con una profundidad promedio de 73.169x, 93.172x y 155.105x, para el RNA 1, 2 y 3, respectivamente (Fig. 2A). El RNA 1 presentó un tamaño de 3.342 nt y un ORF que codifica para la proteína 1a de 995 aminoácidos (aa) implicada en la replicación del virus, pues presenta los dominios funcionales metil-transferasa en el extremo N-terminal y helicasa en el C-terminal. Por su parte, el RNA 2 de 3.024 nt, contiene dos ORF (2a y 2b), que codifican para la replicasa viral (2a), una RNA polimerasa dependiente de RNA (RDRP) y para una proteína supresora de silenciamiento de genes (2b) que se expresa a partir de la estrategia de RNA subgenómico y es referido en este virus como RNA 4A (Zitter y Murphy, 2009). El RNA 3 presentó una extensión de 2.157 nt y tiene dos ORF: el 3a que codifica para una proteína de movimiento (MP) de 279 aa, esencial para el desplazamiento del virus de célula a célula y el 3b codifica para la proteína de la cápside (CP) de 218 aa, que se expresa a partir de un segundo RNA subgenómico, denominado como RNA 4. Esta proteína CP, además de su función protectora del genoma viral, presenta los determinantes de transmisión no persistente del CMV por parte de sus insectos vectores, que corresponden a cerca de 80 especies de áfidos, incluyendo *Myzus persicae* y *Aphis gossypii* (Zitter y Murphy, 2009; Nouri *et al.*, 2014). Las secuencias completas de este genoma fueron depositadas en GenBank con los códigos de acceso: MG696854, MG696855 y MG696856.



**Figura 2. A. Diagrama del genoma del *Cucurbit mosaic virus* (CMV) indicando las posiciones de los ORF identificados y los niveles de profundidad para cada segmento de RNA; B. Árbol filogenético basado en secuencias de la cápside para el aislamiento de CMV de lulo y de otros hospedantes. Los números sobre las ramas indican los valores de *bootstrap* y las denominaciones en la derecha corresponden a los subgrupos hasta ahora identificados en este virus.**

El CMV, especie tipo del género *Cucumovirus* (*Bromoviridae*) (King *et al.*, 2012), es posiblemente uno de los virus de plantas con mayor distribución geográfica y amplio rango de hospedantes, pues se ha reportado infectando cerca de 1.200 especies de plantas de 100 familias botánicas diferentes, incluyendo un alto número de solanáceas (Nouri *et al.*, 2014; Thompson *et al.*, 2015), lo que es compatible con el presente registro sobre *S. quitoense*, que por lo demás se constituye en el primer reporte de este virus sobre este hospedante. El análisis filogenético realizado con base en la secuencia de CP, ubicó al aislamiento obtenido en lulo, en el clado que representa el subgrupo I de dicha especie, y específicamente en el linaje IA (Fig. 2B). En este clado, también se ubicaron aislamientos obtenidos en diferentes países a partir de plantas cucurbitáceas, musáceas y solanáceas, entre otros hospedantes, siendo el aislamiento Bn2ec (KU127245) procedente de banano de Ecuador, el que compartió mayores niveles de identidad (98%) con el CMV de lulo; mientras que dichos niveles fueron del 90-94%, 81% y del 90% con respecto a los aislamientos de los subgrupos

IB, II y III, respectivamente. La especie CMV inicialmente se dividió en los subgrupos I y II, con base en criterios biológicos, serológicos, fisicoquímicos y de porcentajes de hibridación entre genomas (Jacquemond, 2012). Posteriormente, el subgrupo I se separó en dos linajes definidos con base en secuencias del gen CP y de los extremos 5' del RNA 3 (Roossinck *et al.*, 1999) y más recientemente, se encontró un tercer subgrupo (III) a partir de análisis de genomas completos de este virus (Liu *et al.*, 2009; Jacquemond, 2012). Los subgrupos IA y II tienen una distribución global y amplio rango de hospedantes, mientras que el IIB se ha detectado principalmente en Asia; además se han encontrado diferentes cepas de CMV que no se agrupan en ninguno de los tres subgrupos y que representan variantes recombinantes de este virus (Nouri *et al.*, 2014; Thompson *et al.*, 2015). En este sentido, mediante pruebas de RT-PCR convencional y secuenciación Sanger, en este trabajo se confirmó de manera independiente la identidad del linaje IA de otros dos aislamientos de CMV procedentes de plantas individuales de lulo con síntomas de mosaicos y

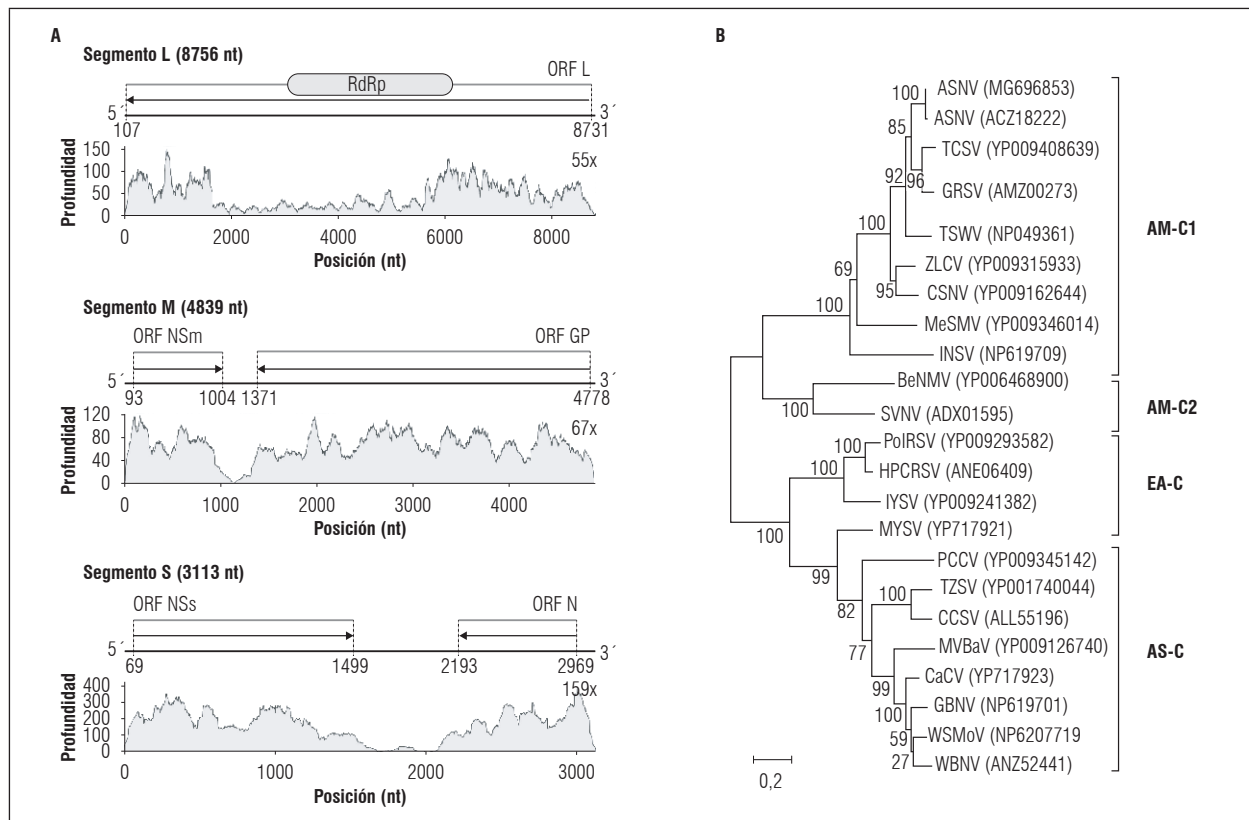
deformación de brotes de un lote de San Vicente Ferrer y otro de Marinilla, obteniéndose un amplicon de 920 pb del RNA 1 con los cebadores diseñados a partir del genoma obtenido mediante NGS. En este caso, ambos amplicones compartieron niveles de identidad superiores al 98% con respecto a secuencias depositadas en GenBank para el linaje IA de este virus (ej. HE793683, AM183117) (Tepfer *et al.*, 2016). Sin embargo, dados los muy altos niveles de diversidad que presenta CMV como resultado no sólo de las altas tasas de mutación propias de los virus de RNA, sino también de la frecuencia de eventos de recombinación homóloga y heteróloga reportados para esta especie viral, y de los re-arreglos genómicos no sólo entre segmentos de cepas de diferentes subgrupos de CMV, sino también entre especies de cucumovirus (ej. CMV y *Peanut stunt virus* -PSV) (Roossinck *et al.*, 1999; Jacquemond, 2012; Thompson *et al.*, 2015), es necesario emprender estudios de variabilidad genética de aislamientos de CMV obtenidos en cultivos de lulo de diferentes regiones del país. Dicha información, será fundamental para diseñar las estrategias de manejo más apropiadas para evitar la dispersión del virus entre regiones del país, identificar reservorios naturales (ej. arvenses), vectores específicos y para el diseño de herramientas de diagnóstico que apoyen futuros programas de certificación de semilla y de mejoramiento genético de este frutal andino.

### *Alstroemeria necrotic streak virus* (Bunyaviridae)

Este virus fue detectado en el transcriptoma de lulo a partir de 6.582 reads, que una vez ensamblados permitieron obtener la secuencia completa (16.708 nt) de los tres segmentos genómicos (RNA: S, M y L) con profundidades de ensamblaje de 55x, 67x y 159x, respectivamente (Fig. 3A). El RNA pequeño (S) tiene una extensión de 3.113 nt y dos ORF, el que codifica para la proteína no estructural (NSs) de 477 aa en el sentido del virión (vs) y que actúa como supresor de RNA de interferencia (RNAi); y el que codifica para la proteína de la nucleocápside (N) de 259 aa en el sentido complementario al virión (vc) (Domínguez y Crespo, 2008; King *et al.*, 2012). El RNA mediano (M) tiene un tamaño de 4.839 nt e igualmente dos ORF ambisentido: el que codifica para la proteína de movimiento (NSm) de 304 aa, en el sentido del virión, y el GnGC (vc) que codifica para el precursor de las glicoproteínas G1 y G2 asociadas a la envoltura externa del virión (Domínguez y Crespo, 2008; King *et al.*, 2012). Finalmente, el RNA grande (L) de polaridad negativa tiene 8.756 nt y un sólo ORF en el sentido vc que codifica para la RNA polimerasa viral de 2.875

a.a. La secuencia del ANSV se depositó en GenBank con los números de accesoión MG696853, MG696852 y MG696851, y corresponde al primer registro en el mundo del genoma completo de este virus.

El ANSV (*Tospovirus*, *Bunyaviridae*) fue reportado inicialmente en Colombia infectando plantas de *Alstroemeria* sp. (Hassani-Mehraban *et al.*, 2010), obteniéndose la secuencia de un segmento de 1.240 nt del RNA S, que incluía el ORF N completo y cerca de 152 nt de la región UTR 5' y 311 nt de la región intergénica; los niveles de identidad encontrados en ese trabajo para la proteína N, correspondieron a niveles del 82, 81 y 80% con respecto a las especies *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) y *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), respectivamente, valores inferiores al 90% indicado como base para diferenciar especies dentro de este género (King *et al.*, 2012). Análisis filogenéticos recientes basados en secuencias del ORF N y de la región 5'-UTR de 28 especies de tospovirus, ubicaron al ANSV en el clado Americano 1 (AM-C1) en conjunto con otras ocho especies que incluyen el TSWV, TCSV y *Pepper necrotic spot virus* (PNSV) (Hassani-Mehraban *et al.*, 2016), previamente reportadas afectando plantas solanáceas en diferentes países suramericanos (Williams *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2012; Ebratt *et al.*, 2013). Este mismo resultado fue obtenido cuando se realizó el análisis filogenético con la secuencia del ORF N derivada del análisis NGS, pues el aislamiento de ANSV de lulo se ubicó en el clado AM-C1 y compartió un 99% de identidad con la secuencia ACZ18222, inicialmente reportada por Hassani-Mehraban *et al.* (2010) en la descripción de esta especie (Fig. 3B). Adicionalmente, Olaya *et al.* (2017) reportaron la infección natural del ANSV en plantas de pimentón y tomate con síntomas de lesiones y anillos necróticos en hojas y tallos, obtenidas en los departamentos de Risaralda y Antioquia, y específicamente para este último, en el municipio de Marinilla, lo que coincide con el presente reporte de ANSV en lulo, pues algunas de las muestras fueron también obtenidas en dicho municipio. De gran interés resultará en el futuro evaluar la patogenicidad cruzada entre aislamientos de ANSV procedentes de estas solanáceas, así como identificar sus vectores específicos, que para los tospovirus, generalmente corresponden a trips (Hassani-Mehraban *et al.*, 2010). La confirmación independiente de la infección de ANSV en plantas de lulo del Oriente Antioqueño, se realizó mediante RT-PCR con cebadores específicos diseñados con base en el genoma del ANSV obtenido en este estudio, y fue positiva (613 pb) para cuatro de las muestras (Tab. 1). Las secuencias obtenidas para



**Figura 3. A. Diagrama del genoma del *Alstroemeria necrotic streak virus* (ANSV) indicando las posiciones de los ORF identificados y los niveles de profundidad para cada segmento de RNA; B. Árbol filogenético basado en secuencias de la cápside para el aislamiento de ANSV de lulo y de otros hospedantes. Los números sobre las ramas indican los valores de bootstrap y las denominaciones en la derecha corresponden a los subgrupos hasta ahora identificados en este virus.**

**Tabla 1. Detección en plantas de lulo de tres virus de RNA mediante RT-PCR con cebadores específicos.**

Lote / Virus	PYVV	CMV	ANSV
Marinilla 1	+, +	-, -	+, +
Marinilla 2	+, +	+, -	+, -
San Vicente 1	+, +	+, +	-, -
San Vicente 2	+, +	+, -	+, -
Sonsón 1	+, -	+, -	-, -

+/-: Resultado de la amplificación por RT-PCR de un fragmento de 495, 920 y 613 pb para PYVV, CMV y ANSV, respectivamente. Los símbolos +/- representan los resultados de las evaluaciones para dos plantas por cada lote.

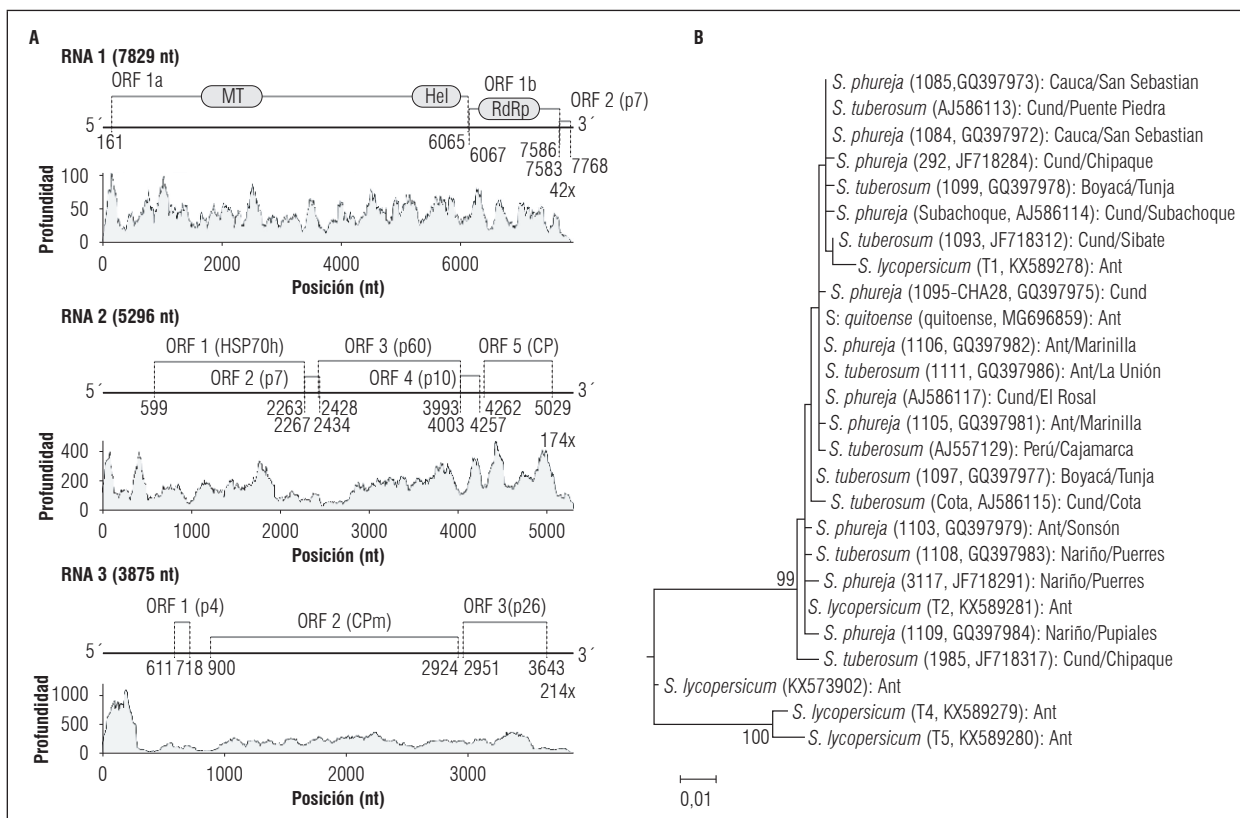
dichas muestras presentaron un 99% de identidad con respecto a dos secuencias del ORF N de aislamientos de ANSV de Colombia y depositadas en GenBank con los números de accesoión KX833218 y GQ478668. La detección de ANSV en este trabajo, reafirma el llamado de atención planteado por Olaya *et al.* (2017)

sobre los riesgos fitosanitarios que puede representar el ANSV en Colombia y otros países andinos sobre cultivos de solanáceas de importancia económica y por esto, de la necesidad de evaluar su distribución geográfica y sus posibles mecanismos de transmisión en campo, evaluaciones en las que se podrían utilizar los cebadores específicos diseñados en este trabajo.

### PYVV (*Closteroviridae*)

De los *reads* virales identificados en el transcriptoma de lulo, 10.480 estuvieron asociados a los tres segmentos genómicos del PYVV (*Crinivirus*, *Closteroviridae*), siendo posible ensamblar sus secuencias completas con tamaños de 7.829 nt (RNA 1), 5.296 nt (RNA 2) y 3.875 nt (RNA 3) y niveles de profundidad de 42x, 174x y 214x, respectivamente (Fig. 4A). En el RNA 1 se identificaron dos ORF, el ORF1 (a y b) que codifica para las proteínas de replicación del virus que incluyen





**Figura 4. A. Diagrama del genoma del Potato yellow vein virus (PYVV) indicando las posiciones de los ORF identificados y los niveles de profundidad para cada segmento de RNA; B. Árbol filogenético basado en secuencias de la cápside para el aislamiento de PYVV de lulo y de otros hospedantes. Los números sobre las ramas indican los valores de bootstrap.**

los dominios de L-proteasa, metiltransferasa, helicasa (1a) y la RdRp (1b); mientras que el ORF2 lo hace para una pequeña proteína hidrofóbica (p7) de 61 aa (Livieratos *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2017). En el RNA 2 se identificaron los cinco ORF reportados para este segmento en los closterovirus y que incluyen la proteína de choque térmico 70 (HSP70h), la proteína pequeña p7 (de función desconocida hasta ahora), la proteína estructural p60, la proteína p10 (de función desconocida) y la cápside viral (CP); el número estimado de aa para dichas proteínas en el aislamiento de PYVV de lulo, correspondió a 554, 55, 521, 84 y 255 aa, respectivamente (Livieratos *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2017). Por su parte, el RNA 3 presentó los ORF que codifican para la proteína pequeña p4 (35 aa), la cápside menor (CPm, 674 aa) y la proteína P26 (230 aa) de función desconocida (Livieratos *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2017). Los números de acceso del genoma de este aislamiento de PYVV corresponden a MG696857, MG696858 y MG696859. Al comparar las secuencias completas de los tres segmentos de este virus con las depositadas en GenBank, se

encontró que el RNA 1 compartía 96% de identidad con respecto a cepas de PYVV obtenidas en papa criolla (KR998193) y tomate (KX573901) en el Oriente de Antioquia y reportadas por Álvarez *et al.* (2017) y Muñoz-Baena *et al.* (2017), respectivamente; mientras que los RNA 2 y 3 presentaron 99% de identidad con la cepa LU1 de papa criolla de La Unión (Antioquia) (KR998194, KR998195) y con la cepa Chota de Cajamarca (Perú), originalmente utilizada por Livieratos *et al.* (2004) en la descripción del genoma de esta especie viral (AJ557129, AJ508757). El análisis filogenético realizado a partir de la secuencia de CP, generó un dendrograma con dos clados, uno mayoritario en donde se ubicó el aislamiento de PYVV de lulo en conjunto con otros 22 aislamientos de Colombia y Perú obtenidos principalmente en papa (*S. tuberosum* y *S. phureja*); mientras que el otro clado sólo incluyó aislamientos de PYVV en tomate, los que recientemente fueron identificados por Muñoz-Baena *et al.* (2017) como una nueva variante de PYVV en Colombia (Fig. 4B). La confirmación independiente por RT-PCR con los cebadores diseñados

por Álvarez *et al.* (2017), resultó positiva para nueve de las diez muestras de plantas individuales (Tab. 1). Al secuenciar tres de los amplicones de 495 pb, se encontraron niveles de identidad del 99% con respecto a diferentes aislamientos de PYVV obtenidos en papa en el Oriente Antioqueño (KR998194, KR998190) y en Cundinamarca (AJ586117, KC257443). En estas zonas productoras de papa de Colombia, el PYVV es uno de los virus que presenta mayores niveles de incidencia en cultivos de papa y papa criolla (Guzmán *et al.*, 2012), e incluso se ha estimado que en dichos hospedantes puede ocasionar pérdidas en rendimiento del 33-48% y 25-50%, respectivamente (Salazar *et al.*, 2000; Guzmán *et al.*, 2012). Este virus induce amarillamientos de venas secundarias en la lámina foliar y es reconocido como restringido al floema y de transmisión natural por moscas blancas de la especie *Trialeurodes vaporariorum* (Guzmán *et al.*, 2012; Álvarez *et al.*, 2017). Además de la papa, su rango de hospedantes incluye el tomate y diversas arvenses como *Catharanthus roseus*, *Malva* sp., *Polygonum* sp., *Tagetes* sp. y *Rumex* sp. (Salazar *et al.*, 2000; Guzmán y Rodríguez, 2010). En el presente estudio, se realiza este nuevo registro en lulo, pues, aunque Salazar *et al.* (2000) habían evaluado su infección en este hospedante en Rionegro (Antioquia), su detección resultó negativa empleando la metodología NASH (*Nucleic Acid Spot Hybridization*). La secuencia completa del genoma de PYVV en lulo, se constituye en el cuarto reporte de este tipo para este virus en el mundo y amplía la base de información para evaluar niveles de variación genética intraespecífica, búsqueda de determinantes de transmisión y la función de algunas de sus proteínas (ej. p4, p26, p7, p10).

En este estudio, utilizando la metodología molecular NGS y confirmación independiente por RT-PCR, se identificaron tres virus multipartitas de RNA (CMV, ANSV, PYVV) infectando plantas sintomáticas de lulo obtenidas en lotes de cultivo del Oriente Antioqueño. Estos hallazgos se unen al reciente reporte de Green *et al.* (2018) en Ecuador, en donde se detectó una nueva especie de tymovirus nombrada tentativamente como Naranjilla chlorotic mosaic virus (NarCMV). En Colombia, aunque se han descrito al menos dos enfermedades de posible origen viral en cultivos de lulo de la región andina del país (departamentos Cundinamarca, Boyacá y Antioquia), denominadas como “virus de la hoja pequeña” y “amarillamiento de la hoja” (Zuluaga, 1996; Vaca *et al.*, 1999); no se ha confirmado plenamente la identidad de sus agentes causales, aunque se ha sugerido que en el primer caso podría ser el PLRV (Tamayo

*et al.*, 2003) y en el segundo, aunque se detectaron secuencias de potyvirus, no se pudo asociar su infección con la sintomatología propia de dicha enfermedad (Vaca *et al.*, 1999). La ocurrencia de infecciones virales como las detectadas en este trabajo asociadas a plantas con diversos de síntomas que incluyen algunos de los descritos para las dos enfermedades indicadas anteriormente (ej. amarillamientos intervenales, deformación de hojas y mosaicos), ya se ha reportado en Colombia para otros frutales solanáceos como tomate de árbol (Jaramillo *et al.*, 2011) y uchuva (Gutiérrez *et al.*, 2015; Álvarez, 2016) y son muestra de que el conocimiento que tenemos del viroma de estos hospedantes es aún incipiente. El hallazgo de estas tres especies de virus afectando cultivos de lulo, conduce al planteamiento de muchos interrogantes sobre la biología, patogenicidad, mecanismos de transmisión, métodos de detección específica y estrategias de manejo de estos problemas fitopatológicos; aunque inicialmente resultará fundamental evaluar la sintomatología específica que cada virus induce en plantas de lulo de las diferentes variedades cultivadas en Colombia, así como su posible patogenicidad cruzada entre solanáceas y otros cultivos frecuentemente intercalados o escalonados con lulo en los andes Colombianos (ej. frijol, arveja). Por último, será fundamental evaluar su posible transmisión por semilla sexual en lulo de Castilla, y por estacas, chupones o injertos para los materiales híbridos que se cultivan en el país.

## CONCLUSIONES

Utilizando la metodología molecular de secuenciación de nueva generación del transcriptoma de plantas de lulo con síntomas asociados a enfermedades virales, se identificó la infección de tres especies de virus de RNA: CMV, ANSV y PYVV, con genomas multipartitas; siendo el CMV, el que presentó mayor porcentaje de *reads* (99,6% de los *reads* virales) en el set de datos obtenido.

En los tres virus detectados fue posible el ensamblaje de sus genomas completos, los que presentaron extensiones de 8.523 nt, 16.708 nt y 17.000 nt para CMV, ANSV y PYVV, respectivamente. El reporte de la secuencia del genoma completo de ANSV es el primero para este tospovirus, mientras que para CMV y PYVV corresponde a los primeros registros de este tipo para aislamientos que infectan lulo.

La infección de los tres virus en muestras sintomáticas foliares de plantas de lulo individuales fue confirmada mediante pruebas de RT-PCR, para lo que fue necesario diseñar cebadores específicos con base en los genomas de CMV y ANSV; mientras que el PVV se detectó con cebadores previamente diseñados para aislamientos de papa. Estos cebadores podrán ser empleados en evaluaciones futuras de niveles de incidencia viral en lotes de cultivo, para apoyar programas de certificación de semilla de lulo o para evaluar los insectos vectores específicos de dichos virus en las diferentes regiones de este cultivo en Colombia y otros países.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia (Proyecto 40817).

**Conflicto de intereses:** el manuscrito fue preparado y revisado con la participación de los autores, quienes declaran no tener algún conflicto de interés que coloquen en riesgo la validez de los resultados aquí presentados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agronet. 2018. Área cosechada, producción y rendimiento de lulo, 2007-2015. En: <http://www.agronet.gov.co>; consulta: enero de 2018.
- Álvarez, N. 2016. Caracterización del viroma en tejido foliar de *Physalis peruviana* en Antioquia utilizando técnicas moleculares. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Álvarez, D., P. Gutiérrez y M. Marín. 2017. Secuenciación del genoma del *Potato yellow vein virus* (PVV) y desarrollo de una prueba molecular para su detección. *Bioagro* 29(1), 3-14.
- Ardila, G., G. Fischer y J.C. García. 2015. La poda de tallos y racimos florales afecta la producción de frutos de lulo (*Solanum quitoense* var. septentrionale). *Rev. Colomb. Cienc. Hortic.* 9(1), 24-37. Doi: 10.17584/rcch.2015v9i1.3743
- Bolger, A.M., M. Lohse y B. Usadel. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15), 2114-2120. Doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Cámara de Comercio de Bogotá. 2015. Manual de lulo. Gill Sans, Bogotá, Colombia.
- Cardona W., L. Bautista-Montealegre, N. Flórez-Velasco y G. Fischer. 2016. Desarrollo de la biomasa y raíz en plantas de lulo (*Solanum quitoense* var. septentrionale) en respuesta al sombrío y anegamiento. *Rev. Colomb. Cienc. Hortic.* 10(1), 53-65. Doi: 10.17584/rcch.2016v10i1.5124
- Domínguez, M. y J.A. Crespo. 2008. El *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), una seria amenaza para nuestro país. *Cuba Tabaco* 9(2), 58-67.
- Ebratt, E., R. Acosta, O. Martínez, O. Guerrero y W. Turizo. 2013. *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), weeds and thrip vectors in the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the Andean region of Cundinamarca (Colombia). *Agron. Colomb.* 31(1), 58-67.
- Franco, G., J. Bernal, M.J. Giraldo y P.J. Tamayo. 2002. El cultivo del lulo. Manual Técnico. Asohfrucol, Bogotá, Colombia.
- Gish, W. y D.J. States. 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat. Genet.* 3(3), 266-272. Doi: 10.1038/ng0393-266
- Grabherr, M.G., B.J. Haas, M. Yassour, J.Z. Levin, D.A. Thompson, I. Amit, X. Adiconis, L. Fan, R. Raychowdhury, Q. Zeng, Z. Chen, E. Mauceli, N. Hacohen, A. Gnirke, N. Rhind, F. di Palma, B.W. Birren, C. Nusbaum, K. Lindblad-Toh, N. Friedman y A. Regev. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* 29(7), 644-652. Doi: 10.1038/nbt.1883
- Green, J., D. Mollov, L. Tran, R. Álvarez-Quinto, J. Ochoa, D. Quito-Ávila y A. Karasev. 2018. Characterization of a new tymovirus causing stunting and chlorotic mosaic in naranjilla (*Solanum quitoense*). *Plant Dis.* 102(5), 911-918. Doi: 10.1094/PDIS-10-17-1534-RE
- Gutiérrez, P.A., J.F. Alzate y M. Marín. 2015. Complete genome sequence of an isolate of *Potato virus X* (PVX) infecting cape gooseberry (*Physalis peruviana*) in Colombia. *Virus Genes* 50(3), 518-522. Doi: 10.1007/s11262-015-1181-1
- Guzmán, M. y P. Rodríguez. 2010. Susceptibility of *Solanum phureja* (Juz. et Buk.) to *Potato yellow vein virus*. *Agron. Colomb.* 28(2), 219-224.
- Guzmán-Barney, M., L. Franco-Lara, D. Rodríguez, L. Vargas y J.E. Fierro. 2012. Yield losses in *Solanum tuberosum* Group Phureja cultivar Criolla Colombia in plants with symptoms of PVV in field trials. *Am. J. Pot. Res.* 89(6), 438-447. Doi: 10.1007/s12230-012-9265-0
- Jaramillo, M., P. Gutiérrez, L.E. Lagos, J.M. Cotes y M. Marín. 2011. Detection of a complex of viruses in tamarillo (*Solanum betaceum*) orchards in the Andean region of Colombia. *Trop. Plant Pathol.* 36(3), 150-159. Doi: 10.1590/S1982-56762011000300003
- Hassani-Mehraban, A., M. Botermans, J.T.L. Verhoeven, E. Meeke, J. Saaijer, D. Peters, R. Goldbach y R. Kormelink. 2010. A distinct tospovirus causing necrotic streak on *Alstroemeria* sp. in Colombia. *Arch. Virol.* 155(3), 423-428. Doi: 10.1007/s00705-010-0590-7
- Hassani-Mehraban, A., M. Westenberg, J.T.J. Verhoeven, B.T.L.H. van de Vossen, R. Kormelink y J.W.

- Roenhorst. 2016. Generic RT-PCR tests for detection and identification of tospoviruses. *J. Virol. Methods* 233, 89-96. Doi: 10.1016/j.jviromet.2016.03.015
- Horvath, J. 1987. Reaction of wild *Solanum* species to different viruses. *J. Indian Potato Assoc.* 14(3-4), 104-108.
- Jacquemond, M. 2012. *Cucumber mosaic virus*. *Adv. Virus Res.* 84, 439-504. Doi: 10.1016/B978-0-12-394314-9.00013-0
- King, A.M.Q., M.J. Adams, E.B. Carstens y E.J. Lefkowitz (eds). 2012. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier; Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Kumar, S., G. Stecher y K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7), 1870-1874. Doi: 10.1093/molbev/msw054
- Li, H. y R. Durbin. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25(14), 1754-1760. Doi: 10.1093/bioinformatics/btp324
- Liu, Y.Y., S.L. Yu, Y.F. Lan, C.L. Zhang, S.S. Hou, X.D. Li, X.Z. Chen y X.P. Zhu. 2009. Molecular variability of five cucumber mosaic virus isolates from China. *Acta Virol.* 53(2), 89-97. Doi: 10.4149/av\_2009\_02\_89
- Livieratos, I., E. Eliasco, G. Muller, R. Olsthoorn, L. Salazar, W. Pleij y R.H. Coutts. 2004. Analysis of the RNA of *Potato yellow vein virus*: evidence for a tripartite genome and conserved 3'-terminal structures among members of the genus *Crinivirus*. *J. Gen. Virol.* 85(7), 2065-2075. Doi: 10.1099/vir.0.79910-0
- Marín, M. y P. Gutiérrez. 2016. Principios de virología molecular de plantas tropicales. Corpoica, Mosquera, Colombia. 10.21930/978-958-740-229-2
- Muñoz-Baena, L., P. Gutiérrez y M. Marín. 2017. Secuenciación del genoma completo del *Potato yellow vein virus* (PYVV) en tomate (*Solanum lycopersicum*) en Colombia. *Acta Biol. Colomb.* 22(1), 5-17. Doi: 10.15446/abc.v22n1.59211
- Nei, M. y S. Kumar. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Nouri, S., R. Arevalo, B.W. Falk y R.L. Groves. 2014. Genetic structure and molecular variability of *Cucumber mosaic virus* isolates in the United States. *PLoS ONE* 9(5), e96582. Doi: 10.1371/journal.pone.0096582
- Olaya, N., N. Velásquez, M. Betancourt, W.J. Cuellar y H.R. Pappu. 2017. First Report of natural infection of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and bell pepper (*Capsicum annuum*) by *Alstroemeria necrotic streak virus* in Colombia. *Plant Dis.* 101(6), 1065. Doi: 10.1094/PDIS-10-16-1396-PDN
- Roosinck, M.J., L. Zhang y K. Hellwald. 1999. Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of *cucumber mosaic virus* RNA3 indicate radial evolution of three subgroups. *J. Virol.* 73(8), 6752-6758.
- Salazar, L., G. Muller, M. Querci, J. Zapata y R. Owens. 2000. *Potato yellow vein virus*: its host range, distribution in South America and identification as a Crinivirus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *Ann. Appl. Biol.* 137(1), 7-19. Doi: 10.1111/j.1744-7348.2000.tb00052.x
- Tepper, M., G. Girardot, L. Feneant, H. Tamarzizt, E. Verdin, B. Moury y M. Jacquemond. 2016. A genetically novel, narrow-host-range isolate of *Cucumber mosaic virus* (CMV) from Rosemary. *Arch. Virol.* 161(7), 2013-2017. Doi: 10.1007/s00705-016-2874-z
- Tamayo, P.J., R.A. Navarro y C. de La Rotta. 2003. Enfermedades del cultivo de lulo en Colombia: guía de diagnóstico y control. Boletín Técnico No.18. Corpoica, Bogotá, Colombia.
- Thompson, J., R. Jamie, L. Langenhan, M. Fuchs y K. Perry. 2015. Genotyping of cucumber mosaic virus isolates in western New York State during epidemic years. Characterization of an emergent plant virus population. *Virus Res.* 210(2), 169-177. Doi: 10.1016/j.virusres.2015.07.028
- Torres, R., J. Larenas, C. Fribourg y J. Romero. 2012. Pepper necrotic spot virus, a new tospovirus infecting solanaceous crops in Peru. *Arch. Virol.* 157(4), 609-615. Doi: 10.1007/s00705-011-1217-3
- Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B.C. Faircloth, M. Remm y S. Rozen. 2012. Primer3- new capabilities and interfaces. *Nucl. Acids Res.* 40(15), 1-12. Doi: 10.1007/s00705-011-1217-3
- Vaca, J., I. Torres, J. Peñaranda y F. Aristizábal. 1999. Identificación de potivirus presentes en plantas de lulo (*Solanum quitoense* Lam.). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2(2), 9-15.
- Williams, L.V., P.M. López, K. Shohara y E.B. Biderbost. 2001. Occurrence and geographical distribution of tospovirus species infecting tomato crops in Argentina. *Plant Dis.* 85(12), 1227-1229. Doi: 10.1094/PDIS.2001.85.12.1227
- Zitter, T.A. y J.F. Murphy. 2009. *Cucumber mosaic virus*. En: *The Plant Health Instructor*, <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/pages/cucumber-mosaic.aspx>; consulta: enero de 2018.
- Zuluaga, M. 1996. Plagas y enfermedades del lulo (*Solanum quitoense* Lam.). Boletín de Sanidad Vegetal - ICA 11, 37-41.



# Efecto de las deficiencias y excesos de fósforo, potasio y boro en la fisiología y el crecimiento de plantas de aguacate (*Persea americana*, cv. Hass)

Effect of deficiencies and excesses of phosphorus, potassium and boron on the physiology and growth of avocado (*Persea americana*, cv. Hass) plants



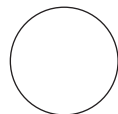
MARÍA ALEJANDRA NOVOA<sup>1, 2</sup>  
DIEGO MIRANDA<sup>2</sup>  
LUZ MARINA MELGAREJO<sup>1, 3</sup>

**Planta juvenil de aguacate var. Hass.**  
Foto: M.A. Novoa

## RESUMEN

Para conocer el efecto de los nutrientes minerales potasio (K), boro (B) y fósforo (P), sobre variables fisiológicas y de crecimiento en aguacate var. Hass, se evaluaron siete tratamientos y cuatro réplicas con tres niveles de dosis: (1) deficiencia del respectivo elemento: 50% de la fertilización completa, (2) completa o tratamiento control: 100% y (3) exceso con un 150% por encima de la fertilización completa, dispuestos en un diseño completamente aleatorio. Las plantas crecieron en bolsas de polietileno, con suelo, y bajo condiciones de invernadero. Se realizó fertilización y riego semanal. Las variables evaluadas fueron el área foliar (AF), número de hojas (NH), contenido relativo de clorofilas (CC), eficiencia máxima fotoquímica del fotosistema II (Fv/Fm) y transpiración (E), además se describió la sintomatología de deficiencias o excesos en hojas. Se encontró que los valores de AF, NH y CC fueron menores en relación con el control. De igual forma, Fv/Fm y la E fueron menores con respecto al control, sugiriendo probable estrés ocasionado por los tratamientos; presentándose en mayor proporción para P, seguido de K y B. Los signos visuales de estrés nutricional se observaron de forma más clara en las plantas sometidas a deficiencia que en aquellas sometidas a exceso, siendo acorde a lo reportado para esta variedad.

**Palabras clave adicionales:** nutrición mineral, área foliar, fluorescencia de la clorofila, transpiración, síntomas de deficiencia y exceso, frutales.



<sup>1</sup> Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (Colombia). ORCID Novoa, M.A.: 0000-0001-5817-4714; ORCID Melgarejo, L.M.: 0000-0003-3148-1911

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (Colombia). ORCID Miranda, D.: 0000-0001-9861-6935

<sup>3</sup> Autor para correspondencia. [Immelgarejom@unal.edu.co](mailto:Immelgarejom@unal.edu.co)



## ABSTRACT

In order to observe the effects of nutrients: potassium (K), boron (B) and phosphorus (P), on physiological and growth variables in avocado var. Hass, seven treatments and four repetitions with three dose levels were evaluated: (1) deficiency of the respective element: 50% or half of the complete fertilization, (2) complete or control treatment: 100%, and (3) excess of the respective element, 150% above the complete fertilization, arranged in a completely random design. The plants were grown in polyethylene bags with soil and cultivated under greenhouse conditions; weekly fertilization and irrigation were also carried out. The evaluated variables included leaf area (LA), number of leaves (NL), relative chlorophyll content (CC), maximum photochemical efficiency of PSII (Fv/Fm) and transpiration (E); the symptomatology of deficiencies and excesses were described in the leaves. The LA, NL and CC values were lower in relation to the control. Similarly, the Fv/Fm and E were lower compared to the control, suggesting probable stress caused by the treatments, presenting a greater proportion of P, followed by K and B. The visual signs of nutrient stress were observed more clearly in the plants subjected to deficiency than in those subjected to excess, consistent with what has been reported for this variety

**Additional key words:** mineral nutrition, leaf area, chlorophyll fluorescence, transpiration, deficiency and excess symptoms, fruits.

Fecha de recepción: 06-04-2018 Aprobado para publicación: 30-05-2018

## INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es el cuarto fruto tropical más importante para el consumo humano a nivel mundial, estimándose una producción global de 5,6 millones de toneladas anuales (FAO, 2016). Una de las variedades de *Persea americana* que se destaca por su actual demanda mundial es la variedad Hass (Bartoli, 2008). Esta presenta óptima calidad en sus frutos, alto rendimiento, maduración tardía (Bernal y Díaz, 2005) y se adapta a condiciones subtropicales y tropicales, con temperaturas de 5 a 19°C y altitudes entre los 1.600 y 2.100 msnm (Mejía, 2010; ICA, 2012).

Los mayores cultivos de aguacate se encuentran en América, donde se destaca México como el primer productor mundial. Colombia ocupa el quinto lugar de los países con mayor área cultivada de aguacate en el mundo (FAO, 2016). Sin embargo, llama la atención que, a pesar del gran potencial que tiene el aguacate como producto exportable, el país no haya podido consolidarse como un exportador neto (Yabrudy, 2008). Además, que internacionalmente Colombia no figure como un productor importante (Agronet, 2016).

Como limitantes en la producción, incide el bajo desarrollo tecnológico del cultivo, los deficientes canales

de comercialización y las pérdidas causadas por plagas (ICA, 2012). Así como la alta demanda interna y la falta de prácticas agrícolas apropiadas que dificultan el acceso a los mercados internacionales (Ríos y Tafur, 2003).

A su vez, Maldonado *et al.* (2013) afirman que algunos de los principales limitantes de la producción son las diferencias entre el rendimiento promedio y los máximos registrados, los cuales estarían indicando la existencia de factores restrictivos de la producción que no han sido identificados apropiadamente y que requieren ser investigados para proponer mejores alternativas, que conduzcan a la obtención de altos rendimientos y óptima calidad de fruto, como es el caso de la nutrición mineral.

De acuerdo con Salazar *et al.* (2009) las recomendaciones de fertilización implementadas en los sistemas de producción de aguacate son generales y suelen ser usadas sin considerar las variaciones en la fertilidad de los suelos, ni la condición nutricional de los árboles, o el efecto de esta sobre los mismos. Esto genera como consecuencia que se apliquen menos nutrientes de los necesarios para maximizar la producción o que se incurra en una aplicación excesiva, lo que conduce a la aparición de desbalances nutricionales, que

además de limitar la productividad pueden producir contaminación de los recursos naturales (Salazar y Lazcano, 2003).

De esta manera es posible afirmar, que la adecuada nutrición mineral de un cultivo está determinada, entre otros, por el conocimiento de los requerimientos de la planta y por la cantidad y disponibilidad de nutrientes del suelo (Salas, 2002).

Es así, como resulta de gran importancia conocer el efecto de la aplicación excesiva o deficitaria de nutrientes, como fósforo, potasio y boro, sobre variables de crecimiento y desarrollo, así como su aspecto sintomatológico en plantas de aguacate, cv. Hass, en su fase vegetativa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización y material vegetal

El estudio se llevó a cabo en los invernaderos de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (4°38'09,1" N y 74°05'13,6" W) a 2.640 msnm, temperatura del aire entre 18-20°C y humedad relativa entre 60-90%. El material vegetal consistió en plantas de aguacate (*Persea americana*, cv. Hass, injertado sobre patrón Criollo) de 8 meses de edad, las cuales se sembraron en bolsas de polietileno (0,5×0,7 m) con suelo proveniente del municipio El Rosal-Cundinamarca (Tab. 1).

Las plantas se mantuvieron en condiciones óptimas de irrigación. La fase de laboratorio se desarrolló en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

### Diseño experimental

Se empleó un diseño completamente aleatorizado (DCA). Se establecieron siete tratamientos y cuatro réplicas de cada uno: tres niveles o dosis de los nutrientes potasio (K), fósforo (P) y boro (B): 50, 100, 150% (Tab. 2). Se realizaron aplicaciones de solución nutritiva de manera semanal. Las fuentes utilizadas fueron: ácido fosfórico líquido, fosfato monopotásico y ácido bórico. En total se evaluaron 84 plantas en 13 muestreos con una frecuencia de 15 d (durante 6,5 meses). En cada muestreo se evaluaron cuatro plantas de cada tratamiento.

### Análisis estadístico

La organización de los datos y el análisis gráfico se realizó con el programa Excel 2016 (Microsoft Office, 2016) y SigmaPlot 10.0. El análisis de los datos se ejecutó con el programa SAS 9.1 (*Statistical Analysis System*), utilizando la prueba de comparación de Duncan con una significancia del 95%. Los datos que no cumplieron supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza fueron sometidos a la transformación de Box y Cox.

**Tabla 1. Características fisicoquímicas del suelo empleado en el estudio.**

pH	CE	CO	N	Ca	K	Mg	Na	Al	CICE	CIC
		%		cmol <sub>(+)</sub> kg <sup>-1</sup>						
5,5	-	7,92	0,68	8,43	0,56	2,57	0,54	0,22	12,3	-
P	S	Cu	Fe	Mn	Zn	B	Ar	L	A	Textura
mg kg <sup>-1</sup>							%			
12,2	60,5	0,32	15,7	4,87	2,24	<0,12	10	32	58	FA

**Tabla 2. Fertilización de las plantas de aguacate de acuerdo con los tratamientos.**

Nutriente	Control	P150	P50	K150	K50	B150	B50
	g/planta-semana						
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	8,6	12,9	4,3	8,6	8,6	8,6	8,6
K <sub>2</sub> O	11,5	11,5	11,5	17,3	5,8	11,5	11,5
B	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	0,5

## Análisis de crecimiento

Se realizaron mediciones directas del número total de hojas de cuatro plantas por tratamiento y el área foliar de tres plantas por tratamiento, esto debido al número total de unidades experimentales disponibles para realizar muestreos destructivos. El área foliar se determinó mediante el software ImageJ® 1-45s (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

## Cuantificación relativa de clorofilas

Se determinó realizando cuatro mediciones en tres hojas completamente expandidas de cuatro plantas diferentes, de cada tratamiento, con un medidor de clorofila portátil (SPAD 502DL; Konica Minolta, Tokio, Japón).

## Fluorescencia de la clorofila

Se realizaron mediciones de la eficiencia máxima fotoquímica del PSII (Fv/Fm) empleando el equipo fluorómetro no modulado modelo Handy PEA (Hansatech Instruments, Pentney, UK) en tres hojas del tercio medio del dosel de cuatro plantas diferentes, por tratamiento. Las hojas fueron adaptadas a oscuridad por 30 min para poder realizar la medición en las primeras horas de la mañana (6:00 a 11:00 h).

## Intercambio de gases

Se evaluó en las primeras horas de la mañana (6:00 a 11:00 h), el intercambio de gases en tres hojas del tercio medio del dosel de cuatro plantas diferentes, monitoreando variables como temperatura de la hoja, resistencia estomática, transpiración y radicación fotosintéticamente activa, empleando el equipo porómetro (LI-1600; Li-Cor, Lincoln, NE).

## Sintomatología

Se realizó la descripción de la sintomatología de las deficiencias y excesos de nutrientes, tanto en hojas jóvenes como adultas.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Análisis de crecimiento

### Número de hojas (NH)

**Potasio.** Se presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) a los 180 días después del trasplante (ddt) entre K50 y el tratamiento K100, y entre todos los

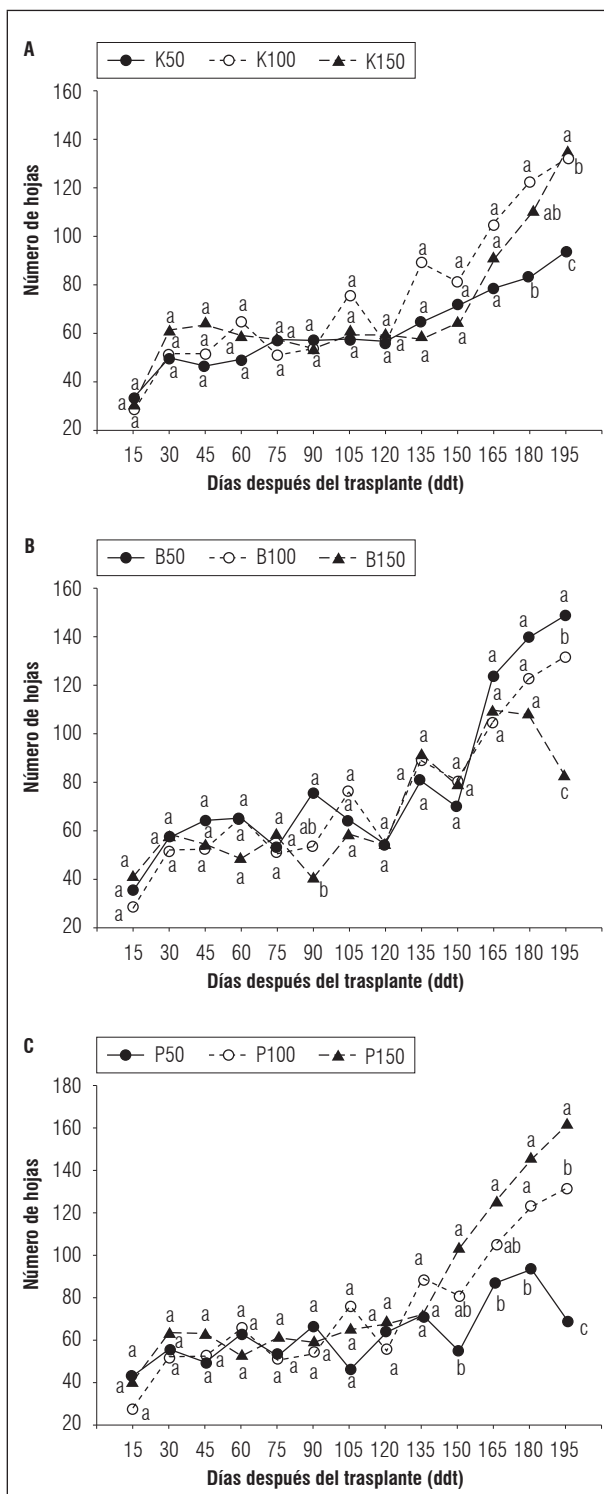
tratamientos a los 195 ddt. A lo largo del ciclo, K50 presentó el más bajo número de hojas (62,4 hojas), siendo 14% menor con respecto a K150 (72,9 hojas) y 18% con K100 (76,1 hojas) (Fig. 1A). De acuerdo con Jordan y Pellerin (2004) el menor número de hojas por deficiencia de K, puede estar relacionado con el retraso en la aparición de las mismas, así como una ligera aceleración en el proceso de senescencia.

**Boro.** Se evidenciaron diferencias estadísticas ( $P \leq 0,05$ ) entre B50 y B150 a los 90 ddt y entre todos los tratamientos a los 195 ddt (Fig. 1B). En general, a lo largo del ciclo de evaluación el tratamiento B50 (82,3 hojas) presentó el mayor NH, seguido de B100 (76,1 hojas) y B150 (68,9 hojas). La superioridad de B50 en esta variable fue del 8% más sobre B100 y 19% con respecto a B150. El menor número de hojas puede asociarse con el efecto defoliante del exceso de este nutriente (Retamales, 2005). El mayor NH en las plantas sometidas a B50, posiblemente se relaciona con la existencia de entrenudos muy cortos, lo cual generó mayor número de nudos (B50: 106 nudos; B100: 97 nudos y B150: 94 nudos) y hojas por unidad de área. Estos resultados coinciden con lo observado por Sindoni *et al.* (1994) en ajonjolí (*Sesamum indicum*), donde la deficiencia severa de B activó las yemas axilares acortando los entrenudos apicales, dando a la arquitectura de la planta y a la disposición de las hojas un aspecto de roseta.

**Fósforo.** Se presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre tratamientos desde los 150 ddt hasta el final del experimento (Fig. 1C). P50 presentó los valores más bajos para esta variable (62,8 hojas), seguido de P100 (76,1 hojas) y P150 (84,9 hojas). El NH de P50 fue 18% menor en relación al de P100 y 26% con respecto al de P150. De acuerdo con el IPNI (2010), el efecto más acentuado de la deficiencia de fósforo en las plantas es la reducción en el número de hojas. Según Kass (1998), el fósforo al ser un nutriente que se encuentra en fuertes concentraciones en los tejidos meristemáticos, ser fuente primaria de energía vía ATP, formar parte de las coenzimas NAD y NADP y participar activamente en la síntesis de proteínas, si hiciese falta, se produciría menor crecimiento y emisión de nuevos órganos vegetativos. Por otra parte, Oliva *et al.* (1995) afirman que las concentraciones superiores de P, no generan un aumento significativo en el NH.

### Área foliar (AF)

El comportamiento del AF mostró una tendencia ascendente en todos los puntos de muestreo. La máxima



**Figura 1. Deficiencias y excesos nutricionales sobre el número de hojas de aguacate 'Hass'. A. Potasio (K); B. Boro (B) y C. Fósforo (P). Promedios con letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos, de acuerdo a la prueba de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).**

AF de las plantas durante el ciclo de cultivo se presentó en aquellas con el tratamiento P150 (9.943,6 cm<sup>2</sup>), seguido del control (9.346,8 cm<sup>2</sup>) a los 180 ddt. Para este mismo periodo de tiempo, el AF mínimo evidenciado en las plantas del tratamiento K50 (5.343,3 cm<sup>2</sup>) mostró una disminución del 43% comparado con el control (Fig. 2A).

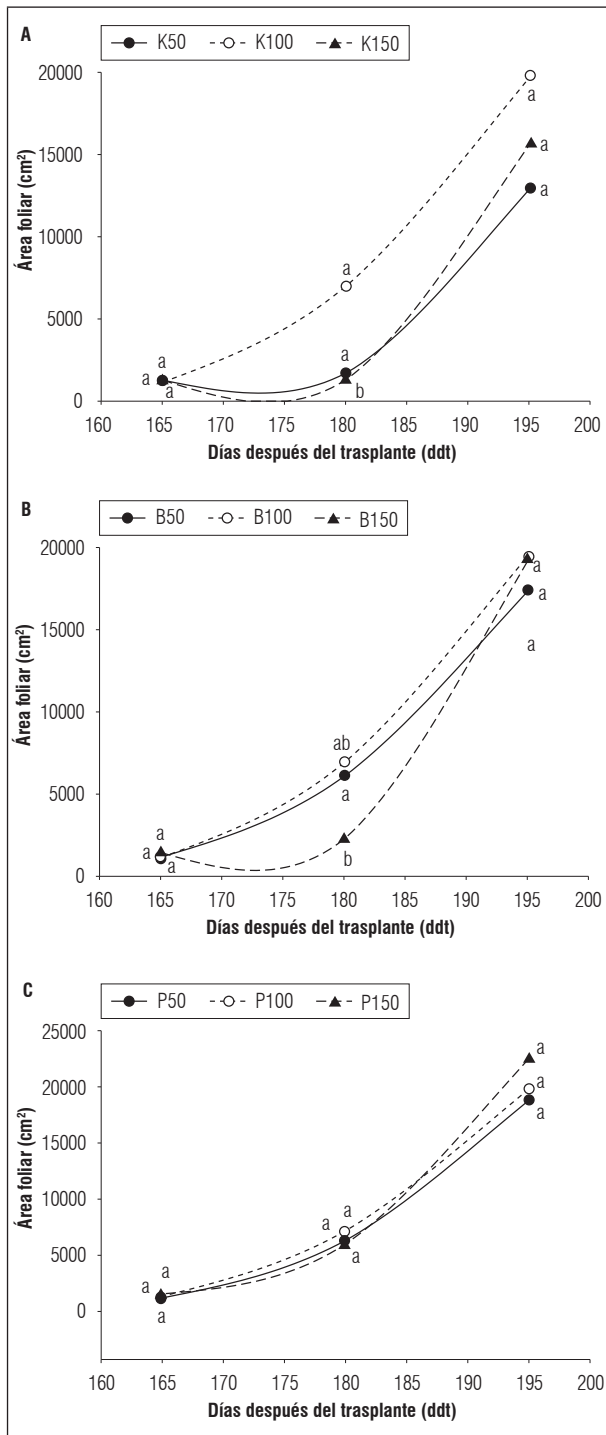
El potasio es el nutriente con mayor efecto sobre la velocidad de crecimiento, principalmente del área foliar (Fairhurst, 1999). En tanto, Pillimue *et al.* (1998) afirmaron que la disminución en el AF presentada por la deficiencia de K, puede ser debida al importante papel que este nutriente cumple para equilibrar la absorción de nitrógeno, mantener la turgencia de las hojas y facilitar el transporte de asimilados.

Por otro lado, las plantas de los tratamientos B150 (7791,8 cm<sup>2</sup>) y P50 (8671,1 cm<sup>2</sup>) presentaron una reducción del AF del 17 y 7%, respectivamente, frente al control (Fig. 2B y 2C). Para el caso del fósforo, su reducción puede ser indicio del importante papel que desempeña este elemento en los procesos energéticos, de tal manera que su deficiencia haya disminuido la formación de hojas. Por su parte, la reducción del AF en el tratamiento B150, puede estar relacionada con el efecto defoliante del exceso de este nutriente (Retamales, 2005).

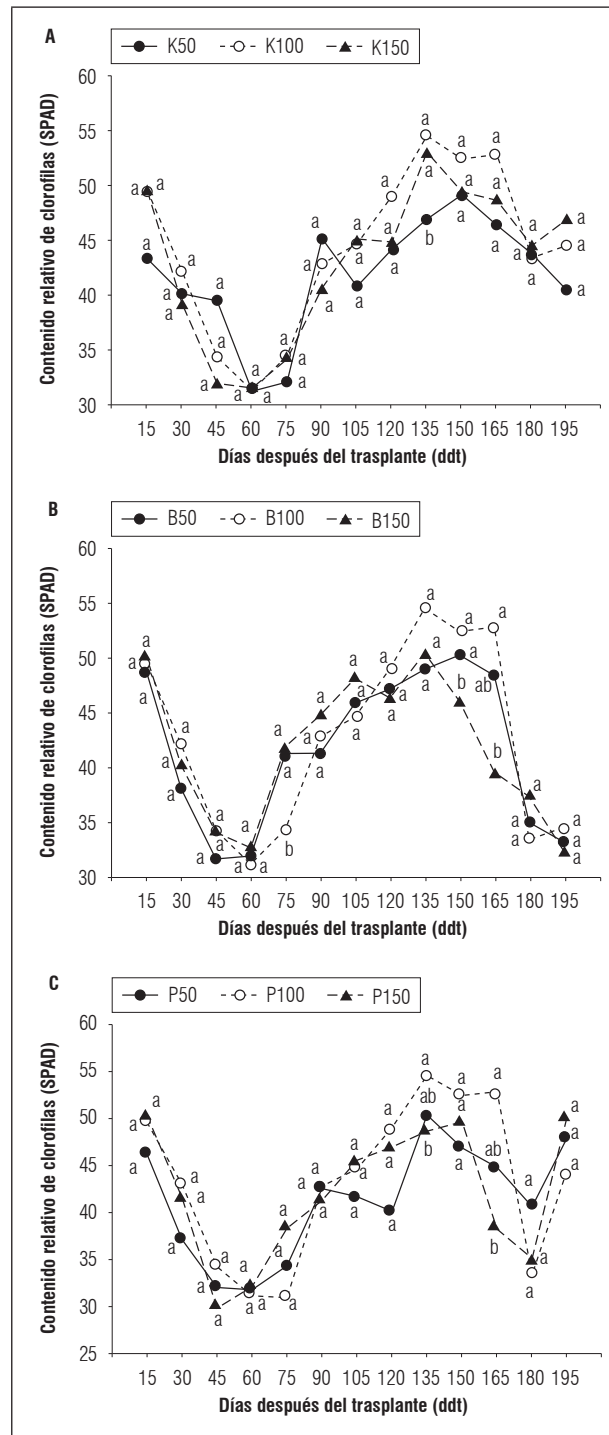
### Contenido relativo de clorofilas

**Potasio.** Se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre el tratamiento K50 y los tratamientos K100 y K150 a los 135 ddt. A lo largo del ciclo pudo observarse que los valores de SPAD, para K50 fueron menores en relación con los de K150 y K100. El contenido relativo total de clorofila en las hojas de plantas con deficiencia de K fue 2,3% menor al de las plantas control (Fig. 3A).

Los resultados de este estudio pese a no ser tan limitantes, pueden correlacionarse con lo encontrado en algodón (*Gossypium hirsutum*) por Zhao *et al.* (2001), quienes determinaron que ante deficiencia de K hubo una disminución del contenido de clorofilas en el 88% respecto al control. Okanenko y Berstein (1969) por su parte, sugieren que el bajo contenido de clorofilas es debido a la pobre ultra estructuración del cloroplasto causada por la deficiencia de K. En contraste, Knypl y Rennert (1970) establecieron que el K, favorece la síntesis de clorofila a partir de mecanismos específicos, lo cual puede relacionarse con los mayores valores presentados por K100 y K150.



**Figura 2.** Deficiencias y excesos nutricionales sobre el área foliar de aguacate 'Hass'. A. Potasio (K); B. Boro (B) y C. Fósforo (P). Promedios con letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos, de acuerdo con la prueba de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 3.** Deficiencias y excesos nutricionales sobre el contenido relativo de clorofilas (SPAD) de aguacate 'Hass'. A. Potasio (K); B. Boro (B) y C. Fósforo (P). Promedios con letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos, de acuerdo con la prueba de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).



**Boro.** Se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre B100 y los tratamientos B50 y B150 a los 75 ddt y entre B150 y B100 a los 150 y 165 ddt (Fig. 3B).

Mouhtaridou *et al.* (2004) sugieren a partir de su estudio con manzana (*Malus domestica*), que el contenido de clorofilas decrece a medida que la concentración de B aumenta, lo cual puede asociarse con los menores valores presentados por B150, respecto a B100.

En forma complementaria, a lo largo del ciclo de evaluación se pudo observar que el tratamiento B50 (42,1 SPAD) presentó en promedio un contenido relativo de clorofilas de 3,5% menor, en relación al de B100 (43,6 SPAD). Este resultado estaría en concordancia con Sharma y Ramchandra (1990), quienes encontraron que la deficiencia de B reduce el contenido de clorofilas y proteínas solubles en las hojas, lo que resulta en una inhibición de la reacción de Hill y la tasa de fotosíntesis neta.

**Fósforo.** Se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre el tratamiento P150 y P100 a los 135 y 165 ddt. De acuerdo con Quintana *et al.* (2017) ante exceso de fósforo los contenidos de clorofila tienden a reducirse drásticamente debido a la ocurrencia de un antagonismo con aniones como el  $\text{NO}_3^-$  ya que la capacidad fotosintética y, por ende, la clorofila, están relacionadas directamente con el contenido de fósforo y de nitrógeno en la planta (Singh y Reddy, 2015).

En adición, al analizar los resultados como consolidado, fue posible evidenciar que los valores para P50 (41,2 SPAD) fueron menores en un 5,5 % al compararlos con los valores de P100 (43,6 SPAD) (Fig. 3C). Esta reducción de los pigmentos fotosintéticos, bajo la deficiencia fue consistente con otros estudios (Singh *et al.*, 2013). Singh *et al.* (2017) sugieren que bajo deficiencia de P la disminución en el contenido de clorofilas se produce como un mecanismo para evitar el exceso de captación de luz, en pro de proteger el PSII del daño lumínico.

### Fluorescencia de la clorofila

En la figura 4 no se observó un patrón claro de la Fv/Fm para los diferentes tratamientos, que durante los primeros 90 ddt los valores se alejaron ligeramente del valor de referencia 0,83 para plantas sin estrés (Percival, 2004; Kitajima y Butler, 1975). Esto podría indicar un ajuste de respuesta de la planta frente a las nuevas

condiciones del sitio de evaluación. Un patrón similar se observó en el parámetro de transpiración (Fig. 5).

**Potasio.** Solamente se presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) a los 195 ddt entre K50 y los tratamientos K100 y K150 (Fig. 4A).

Aunque los efectos de la deficiencia de K son evidentes en variables relacionadas con el intercambio gaseoso, su relación con la eficiencia del PSII se conoce poco. Se reporta que la deficiencia de este elemento no tiene un efecto significativo sobre la eficiencia máxima potencial de las plantas (Saeed *et al.*, 2009). De acuerdo con Salazar-García (2002), el exceso de potasio puede causar deficiencia de Mg y Yuan *et al.* (2016) describieron en plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) deficientes de Mg una disminución en Fv/Fm, lo cual atribuyeron a que el Mg está involucrado en la modulación de la actividad de enzimas fotosintéticas como la Rubisco (Laing *et al.*, 2000). De igual forma, Ling *et al.* (2009), mencionan que las limitaciones no estomáticas pueden ser los principales factores que determinan la respuesta de la fotosíntesis cuando se presenta deficiencia de Mg, ya que, la baja asimilación de  $\text{CO}_2$  está acompañada por un incremento de la concentración de  $\text{CO}_2$  intercelular. La deficiencia de Mg induce un deterioro en el transporte lineal de electrones fotosintéticos, causando foto inhibición en las hojas por aumento de las especies reactivas de oxígeno, lo que conduce en un incremento de la emisión de luz en forma de fluorescencia para proteger el PSII.

**Boro.** Únicamente se presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) a los 15 ddt entre B50 y B150 (Fig. 4B). Momento para el cual B50 presentó valores 2,1 y 7,9% menores a los exhibidos por B100 y B150, respectivamente. Estos resultados son acordes con lo descrito por Dell y Huang (1997) quienes indican que la deficiencia de B puede afectar indirectamente la fotosíntesis porque reduce el área fotosintéticamente activa y altera los constituyentes foliares.

Pese a que los resultados del experimento no demostraron de forma clara el efecto del exceso de B sobre la relación Fv/Fm, autores como Gimeno *et al.* (2012) reportan que los mayores niveles de B generan una reducción significativa de la relación Fv/Fm. Ellos atribuyen este comportamiento a la pérdida de la eficiencia cuántica del PSII, debido a un daño en el complejo captador de luz (Guerfel *et al.*, 2009). Asimismo, Papadakis *et al.* (2004) explican que otra de las consecuencias del exceso de B en las hojas, es el daño en la estructura del cloroplasto, lo cual tiene un efecto directo sobre la tasa de fotosíntesis.

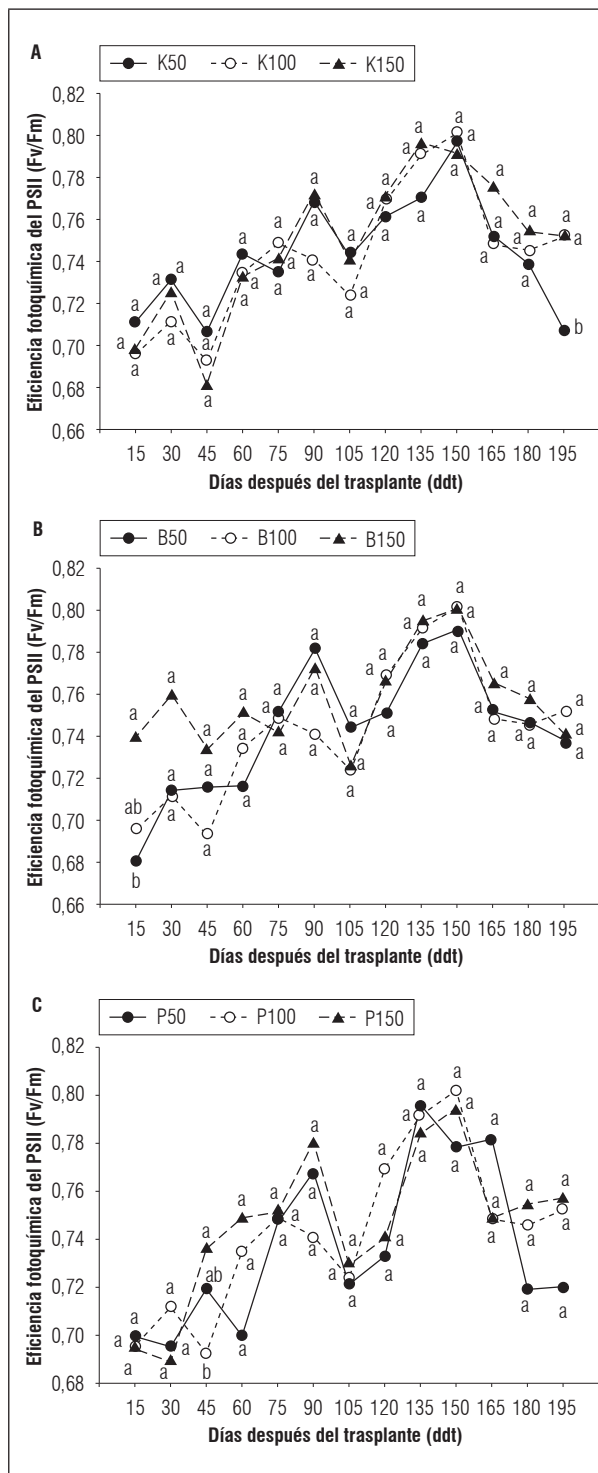
**Fósforo.** Se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre P150 y P100 a los 45 ddt. Momento en el cual P150 mostró valores para Fv/Fm 6,3% mayores a los presentados por P100 (Fig. 4C).

Es sabido que el P no afecta directamente la fotosíntesis, pero es un nutriente fundamental en el metabolismo de las plantas, como componente de ácidos nucleicos y de moléculas ricas en energía (Jiménez *et al.*, 2015). A pesar de ello, según Salazar-García (2002), el exceso de fósforo puede ocasionar deficiencias de manganeso (Mn). Roosta *et al.* (2017) encontraron en plantas de lechuga (*Lactuca sativa*), que la relación Fv/Fm fue significativamente afectada por la deficiencia de este microelemento. Este efecto ocurre como resultado de los daños a los centros de reacción del PSII, por el incremento de las cantidades de electrones y radicales libres. De igual forma, Qu *et al.* (2012) afirman que el estrés por deficiencia de Mn disturba severamente el transporte de electrones o genera un daño en la estructura de la membrana tilacoidal en el lado donador del PSII.

Por otra parte, y a pesar de la ausencia de diferencias significativas en el comportamiento de P50 respecto al de P100, es importante agregar que la deficiencia de P, puede llegar a generar una disminución en Fv/Fm, por la producción de una fotoinhibición en las hojas (Singh *et al.*, 2017). La fotoinhibición usualmente resulta en una reducción de la eficiencia cuántica relativa del PSII, y ésta en una reducción en el transporte de electrones, lo cual puede atribuirse a una disminución del número de centros de reacción del PSII y la eficiencia en la captura de energía por estos centros (He *et al.*, 2011).

## Transpiración

**Potasio.** Se presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre K100 y K50 a los 30 ddt y entre K150 y los tratamientos K100 y K50 a los 150 ddt (Fig. 5A). Haciendo referencia al efecto de la deficiencia de K, Behboudian y Anderson (1990) en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), y Zhao *et al.* (2001), en plantas de algodón (*Gossypium hirsutum*), determinaron, que esta genera una disminución significativa de la tasa de transpiración, lo cual se traduce en una supresión del crecimiento. Adicionalmente, Tang *et al.* (2015) indicaron que existe evidencia sustancial, para afirmar que el daño en la estructura de los cloroplastos causada por la deficiencia de K, altera la regulación estomatal y no estomatal de  $\text{CO}_2$  y el flujo de  $\text{H}_2\text{O}$  en



**Figura 4.** Deficiencias y excesos nutricionales sobre la eficiencia máxima fotoquímica del PSII (Fv/Fm) en aguacate 'Hass'. A. Potasio (K); B. Boro (B) y C. Fósforo (P). Promedios con letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos, de acuerdo con la prueba de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

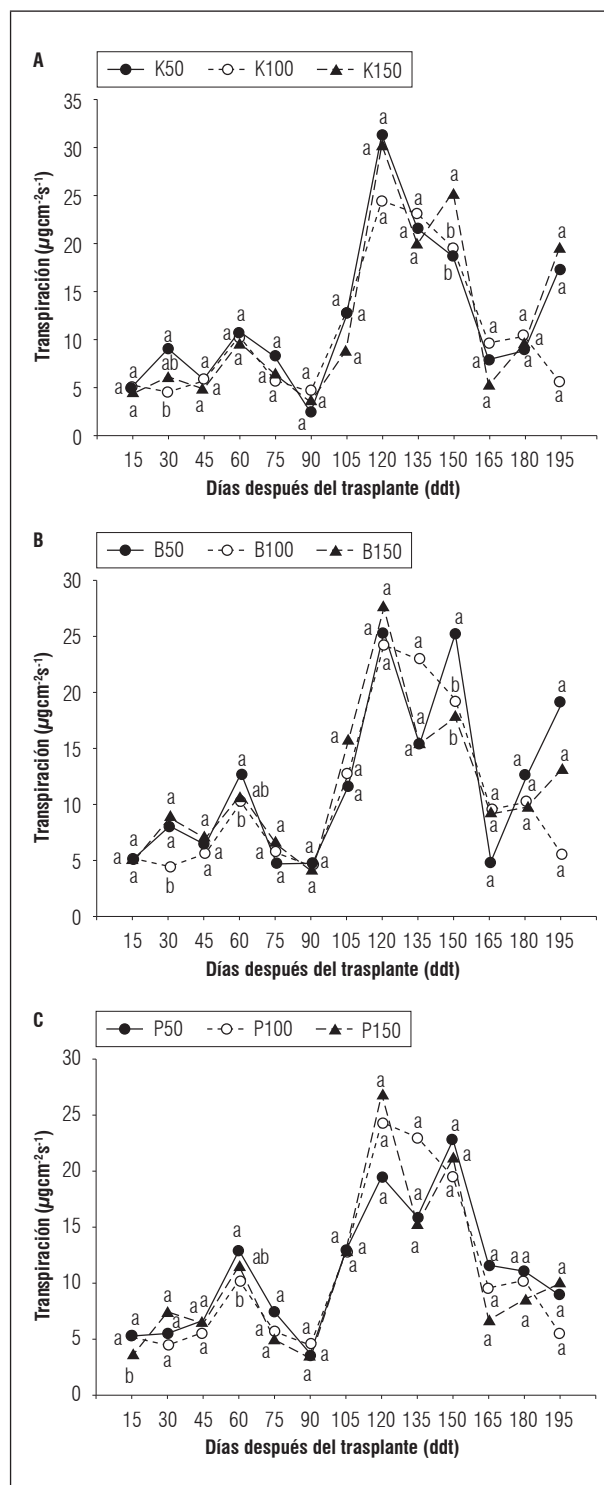
las hojas, limitando así la tasa transpiratoria. Sin embargo, para el caso específico de este estudio, se pudo establecer que la deficiencia de K al 50%, no generó un detrimento considerable de la tasa de transpiración, debido probablemente a que los niveles de K no fueron lo suficientemente bajos como para promover esta reacción.

De igual forma, al observar el comportamiento de las plantas ante el exceso de K a los 150 ddt, se evidencia que estas presentaron valores significativamente mayores en relación con los del control. Este resultado puede correlacionarse con lo encontrado por Farhat *et al.* (2013) en plantas de girasol (*Helianthus annuus*), donde se establece que tanto por efecto del exceso K como por el efecto de deficiencia de Mg, pueden ocurrir alteraciones en la tasa de transpiración.

**Boro.** Se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre B100 y los tratamientos B150 y B50 a los 30 ddt. Y entre B50 y los tratamientos B100 y B150 a los 150 ddt. (Fig. 5B). No obstante, la mayor transpiración presentada por B50 a los 150 ddt, está en contra posición con lo descrito por Mukhopadhyay *et al.* (2013) en plantas de té (*Camellia sinensis*), sometidas a deficiencia de B. Puesto que, ellos establecieron que, ante deficiencia de B se produce un decrecimiento de la tasa de transpiración, la cual se relaciona con una baja conductancia estomática, causada por el alto daño oxidativo en las hojas. Por lo cual, concluyen que todos los parámetros relacionados con el intercambio gaseoso son influenciados por la deficiencia del nutriente. Adicionalmente, sugieren que la aparición de hexosas libres puede desencadenar una baja regulación del ciclo de Calvin y por ende inhibir las tasas de fotosíntesis.

En contraste, cuando se analizan los resultados presentados por B150 se observa que están en concordancia con lo expuesto por Shani *et al.* (1992), quienes reportan que el exceso de B no genera una reducción significativa en la transpiración. Pero que, si la concentración de B aumenta exponencialmente, la tasa transpiratoria comenzará a verse afectada (Ben-Gal y Shani, 2003).

**Fósforo.** Se evidenciaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre P150 y los tratamientos P100 y P50 a los 15 ddt, y entre P50 y P100 a los 60 ddt (Fig. 5C). La menor tasa de transpiración expuesta por P150 a los 15 ddt, puede asociarse al efecto del bloqueo de la asimilación de K, causado por un aumento del flujo de Mg ante exceso de P (Navarro y Navarro, 2014).



**Figura 5. Deficiencias y excesos nutricionales sobre la transpiración de aguacate 'Hass'. A. Potasio (K); B. Boro (B) y C. Fósforo (P). Promedios con letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos, de acuerdo con la prueba de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).**

Lo cual se explica a través del papel que ejerce el K sobre la regulación estomatal y no estomatal de CO<sub>2</sub> y el flujo de H<sub>2</sub>O en las hojas (Tang *et al.*, 2015).

A su vez, también es posible establecer que el comportamiento de P50 frente a P100, discierne de lo reportado en la literatura. Veronica *et al.* (2017) afirman que la deficiencia de P resulta en una reducción de la tasa de transpiración, así como de la conductancia estomática y la concentración intercelular de CO<sub>2</sub>, lo cual atribuyeron a una limitación estomática.

### Sintomatología

**Potasio.** Los síntomas de la deficiencia se presentaron únicamente en hojas bajas, primero en forma de una banda amarillenta ancha cerca del borde, seguida de otra verde claro que dejó ver áreas pequeñas más oscuras de bordes indefinidos (Fig. 6A). Posteriormente estas mostraron las venas amarillas y áreas necróticas café rojizo desde los bordes hacia el interior de la lámina. En algunos casos se presentó necrosis en los bordes de las hojas limitada por un halo verde amarillento. Las hojas jóvenes presentaron clorosis leve (Fig. 6B y 6C).

De acuerdo con Salazar-García (2002), el exceso de potasio puede causar deficiencias de Ca o Mg. En las plantas sometidas a exceso fue posible observar una clorosis leve, que inició en el ápice o por la zona media de la hoja y avanzó por los bordes hacia toda la lámina (Fig. 7A y 7B). Lo cual puede asociarse a síntomas relacionados con deficiencia Mg, similares a lo descrito por Navarro y Navarro (2000). En algunas plantas se

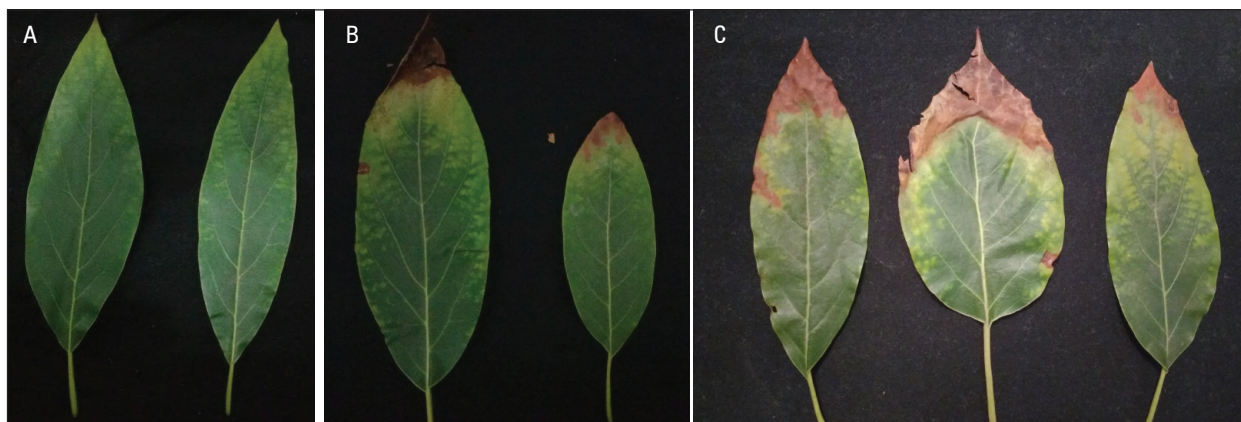
observaron síntomas asociados a clorosis de la lámina foliar, acompañados de puntos necróticos que coalescen en los bordes sin un patrón evidente (Fig. 7C y D).

**Boro.** En general, las plantas deficientes en boro presentaron los primeros síntomas en las hojas jóvenes; estas se tornaron más pequeñas, flácidas y perdieron el brillo. Cuando la deficiencia avanzó, se presentaron deformaciones en la lámina. Adicionalmente, se presentó clorosis que inició en el ápice de las hojas. Por el contrario, en hojas adultas se observó una coloración verde claro ligeramente mate (Fig. 8).

Ante el exceso, pudo observarse necrosis apicales y un aumento de tamaño en la lámina foliar (Fig. 9), esto quizás asociado a un aumento en el nivel de RNA y, en consecuencia, un incremento de la división celular en los meristemos (Wild y Jones, 1992), esto por el papel del elemento en la elongación celular y la síntesis de ácidos nucleicos (Taiz y Zeiger, 2010).

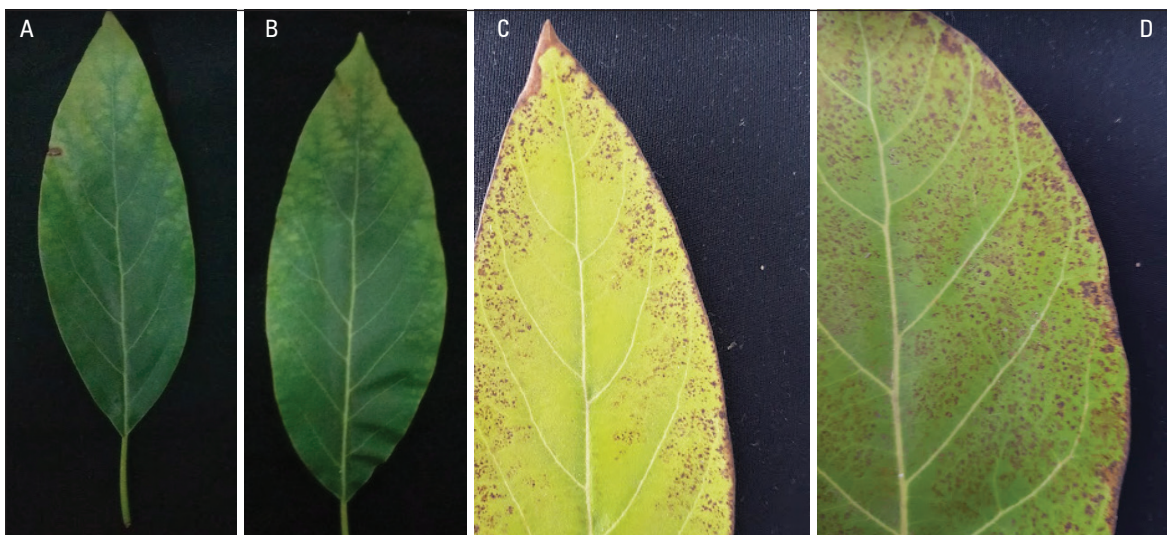
**Fósforo.** Los síntomas de deficiencia se manifestaron como una clorosis difusa de tono opaco en las hojas adultas (Fig. 10A), esta evolucionó como manchas necróticas sin patrón definido (Fig. 10C-E). La textura de las hojas se tornó coriácea, mientras que el color se mantuvo verde muy oscuro sin brillo. La venación se conservó de color verde oscuro. No se observó clorosis generalizada en hojas jóvenes ni en el resto de la planta. Sin embargo, se presentó una leve evidencia de acumulación de antocianinas (Fig. 10B).

De acuerdo con Salazar-García (2002) el exceso de fósforo puede manifestarse como deficiencias de micronutrientes como Mn y/o Zn.



**Figura 6.** Síntomas de deficiencia de potasio en hojas de plantas de aguacate var. Hass. A. Clorosis en forma de banda; B y C. Avance de necrosis en hojas adultas.





**Figura 7. Síntomas de exceso de potasio en hojas de plantas de aguacate var. Hass. A y B. Clorosis en hojas adultas; C y D. Puntos necróticos sin patrón evidente.**

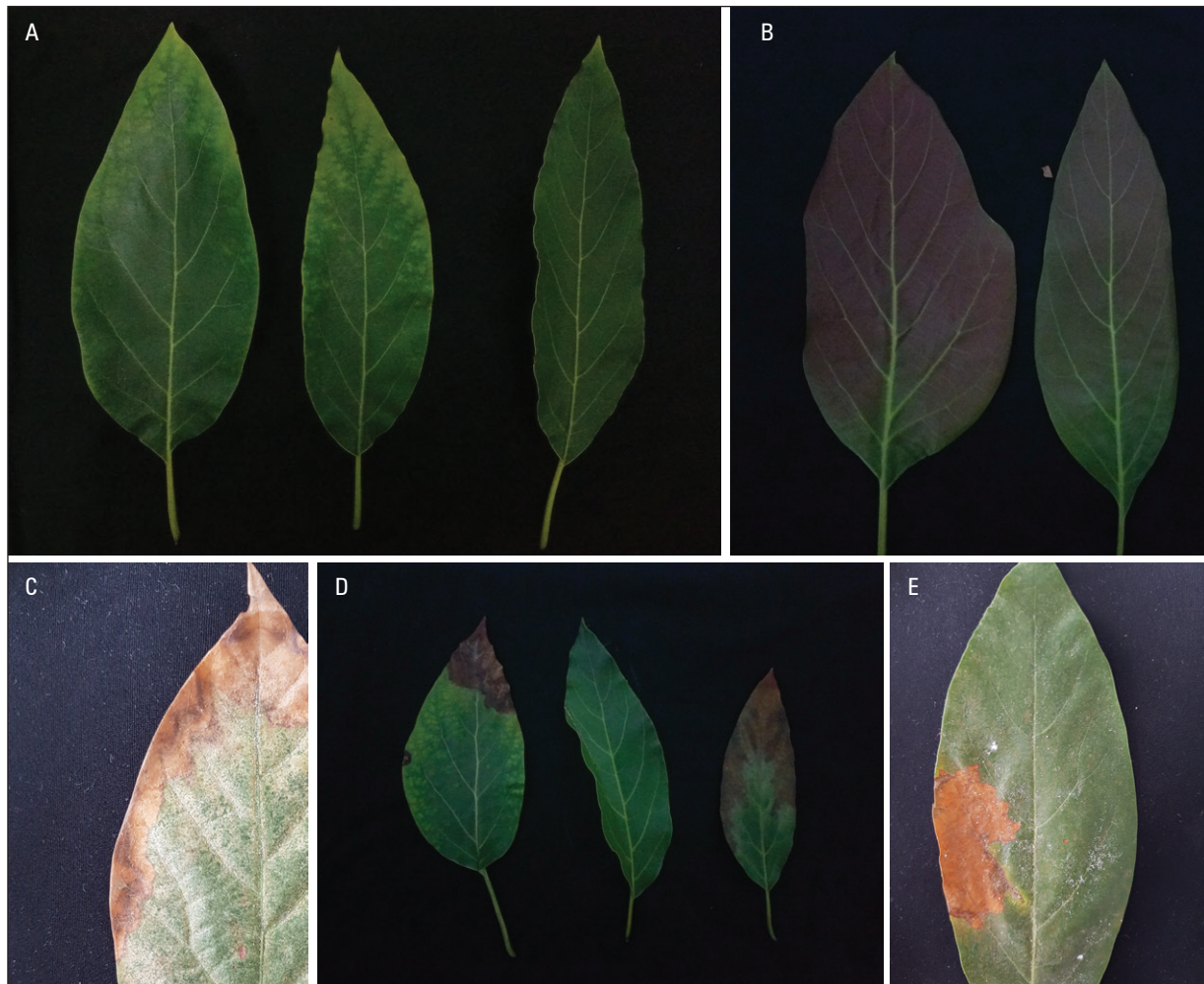


**Figura 8. Síntomas de deficiencia de boro en hojas de plantas de aguacate var. Hass.**



**Figura 9. Síntomas de exceso de boro en hojas de plantas de aguacate var. Hass.**





**Figura 10.** Síntomas de deficiencia de fósforo en hojas de plantas de aguacate var. Hass. A. Clorosis en hojas adultas; B. Acumulación de antocianinas en hojas jóvenes; C., D. y E. Manchas necróticas sin patrón definido.



**Figura 11.** Síntomas de exceso de fósforo en hojas de plantas de aguacate var. Hass. Hojas jóvenes cloróticas y con crecimiento lanceolado.

En las plantas sometidas a exceso de P pudo observarse síntomas de clorosis en hojas jóvenes, no muy intensa y extendida en la lámina de la hoja. Lo cual coincidiría con lo descrito por Sierra (2003), para los síntomas de deficiencia de Mn. Adicionalmente pudo evidenciarse un crecimiento algo lanceolado y reducido en hojas nuevas (Fig. 11). Hernández y Pacheco (1986) describen estos síntomas para la deficiencia de Zn en cardamomo (*Elettaria cardamomum*).

## CONCLUSIONES

Las plantas de aguacate var. Hass en fase vegetativa del crecimiento, bajo condiciones de invernadero de plástico y sometidas a deficiencia de potasio o exceso de boro, presentaron los menores valores para las variables número de hojas y área foliar en comparación con el control.

En cuanto a parámetros relacionados con fotosíntesis e intercambio de gases, se observó que los tratamientos de deficiencia y exceso de los nutrientes evaluados no presentaron diferencias significativas consistentes a través del tiempo, respecto al control. Esto podría estar sugiriendo que la deficiencia al 50% y el exceso al 150%, no son lo suficientemente limitantes como para generar un detrimento considerable de dichos procesos fisiológicos. Adicionalmente, estos resultados constituirían una evidencia para considerar que la dosis comercial no provee los niveles óptimos de nutrientes, puesto que las plantas a lo largo del ciclo no expusieron los valores de referencia.

Finalmente, al referirse a la expresión de síntomas visuales de estrés nutricional, es posible indicar que esta ocurrió de forma más evidente en plantas sometidas a deficiencias, que en las sometidas a excesos. Esto último posiblemente asociado a que, al no ser la dosis comercial aquella que proveyera los niveles óptimos de nutrientes, la dosis al 150% no estaría representando realmente un exceso.

## AGRADECIMIENTOS

A Colciencias por la financiación de este trabajo de grado (M.A. Novoa-Torres) enmarcado en el proyecto "Ecofisiología, nutrición mineral y manejo integrado de plagas y enfermedades en aguacate, curuba, gulupa y tomate de árbol orientados hacia su manejo agronómico, como materia prima para el desarrollo de productos de interés comercial" coordinado por L.M.

Melgarejo, de la Red Nacional para la bioprospección RIFRUTBIO contrato 459/2013. Al Departamento de Biología y la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

**Conflicto de intereses:** el manuscrito fue preparado y revisado con la participación de los autores, quienes declaran no tener algún conflicto de interés que coloquen en riesgo la validez de los resultados aquí presentados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agronet. 2016. Aguacate Hass colombiano entra en la recta final para exportar a Estados Unidos. En: Agronet, <https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/Aguacate-Hass-colombiano-entra-en-la-recta-final-para-exportar-a-Estados-Unidos.aspx>; consultado: octubre de 2017.
- Bartoli, J. 2008. Manual técnico del cultivo de aguacate Hass (*Persea americana* L.). Centro de Comunicación Agrícola de la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), Lima, Perú.
- Behboudian, M. y D. Anderson. 1990. Effects of potassium deficiency on water relations and photosynthesis of the tomato plant. *Plant Soil* 127, 137-139. Doi: 10.1007/BF00010846
- Ben-Gal, A. y U. Shani. 2003. Water use and yield of tomatoes under limited water and excess boron. *Plant Soil* 256, 179-186. Doi: 10.1023/A:1026229612263
- Bernal, J. y C. Díaz. 2005. Tecnología para el cultivo del Aguacate. Manual Técnico No. 5. Colombia: Centro de Investigación La Selva, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), Rionegro, Antioquia.
- Dell, B. y L. Huang. 1997. Physiological response of plants to low boron. *Plant Soil* 193, 103-120. Doi: 10.1023/A:1004264009230
- Fairhurst, T. 1999. Nutrient use efficiency in oil palm: measurement and management. *The Planter* 75, 173-177.
- FAO. 2016. FAOSTAT statistics database. En: <http://www.fao.org/statistics/es/>; consultado: octubre de 2017.
- Farhat, N., M. Rabhi, H. Falleh, K. Lengliz, A. Smaoui, C. Abdelly y M. Lachaal. 2013. Interactive effects of excessive potassium and Mg deficiency on safflower. *Acta Physiol. Plant* 35, 2727-2745. Doi: 10.1007/s11738-013-1306-x
- Gimeno, V., L. Simón, M. Nieves, V. Martínez y J. Cámara. 2012. The physiological and nutritional responses to an excess of boron by Verna lemon trees that were

- grafted on four contrasting rootstocks. *Trees* 26, 1513-1526. Doi: 10.1007/s00468-012-0724-5
- Guerfel, M., O. Baccouri, D. Boujnah, W. Chaibi y M. Zarrouk. 2009. Impacts of water stress on gas exchange, water relations, chlorophyll content and leaf structure in the two main Tunisian olive (*Olea europea* L.) cultivars. *Sci. Hortic.* 119, 257-263. Doi: 10.1016/j.scienta.2008.08.006
- He, G., J. Zhang, X. Hu y J. Wu. 2011. Effect of aluminum toxicity and phosphorus deficiency on the growth and photosynthesis of oil tea (*Camellia oleifera* Abel.) seedlings in acidic red soils. *Acta Physiol. Plant.* 33, 1285-1292. Doi: 10.1007/s11738-010-0659-7
- Hernández, R. y R. Pacheco. 1986. Caracterización de síntomas visuales de deficiencias nutricionales en cardamomo (*Elettaria cardamomum*). *Agron. Costarr.* 10(1/2), 13-27.
- IPNI (International Plant Nutrition Institute). 2010. Funciones del fósforo en las plantas. *Informaciones Agro-nómicas* No. 36. IPNI, Peachtree Corners, GA, USA.
- ICA (Instituto Colombiano Agropecuario). 2012. Manejo fitosanitario del cultivo del aguacate Hass (*Persea americana* Mill): medidas para la temporada invernal. Bogotá, Colombia.
- Jiménez, S., O. Alvarado y H. Balaguera. 2015. Fluorescencia como indicador de estrés en *Helianthus annuus* L. Una revisión. *Rev. Colomb. Cienc. Hortic.* 9(1), 149-160. Doi: 10.17584/rcch.2015v9i1.3753
- Jordan, L. y S. Pellerin. 2004. Leaf area establishment of a maize (*Zea mays* L.) field crop under potassium deficiency. *Plant Soil* 265, 75-92. Doi: 10.1007/s11104-005-0695-z
- Kass, D. 1998. Fertilidad de suelos. Ed. Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica.
- Kitajima, M. y W. Butler. 1975. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim. Biophys. Acta* 376, 105-115. Doi: 10.1016/0005-2728(75)90209-1
- Knypl, J. y A. Rennert. 1970. Stimulation of growth and chlorophyll synthesis in detached cotyledons of cucumber by potassium. *Z. Pflanzenphysiol.* 62, 97-107.
- Laing, W., D. Greer, O. Sun, P. Beets, A. Lowe y T. Payn. 2000. Physiological impacts of Mg deficiency in *Pinus radiata*: growth and photosynthesis. *New Phytol.* 146, 47-59. Doi: 10.1046/j.1469-8137.2000.00616.x
- Ling, L., L. Peng, L. Cao, C. Jiang, C. Chun, G. Zhang y Z. Wang. 2009. Effect of magnesium deficiency on photosynthesis characteristic of Beibei 447 Jincheng orange. *J. Fruit Sci.* 26, 275-280.
- Maldonado, R., M. Álvarez, G. Almaguer, A. Barrientos y R. García. 2013. Estándares nutrimentales para aguacate-ro "Hass". *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 13(1), 103-108.
- Mejía, A. 2010. Cadena Productiva del Aguacate en Colombia. Consejo Nacional del Aguacate. pp. 5-30. En: *Memorias, II Encuentro de la Cadena Productiva del Aguacate*. Corporación Antioqueña del Aguacate, Rionegro, Colombia.
- Mouhtaridou, G., T. Sotiropoulos, K. Dimassi y I. Therios. 2004. Effects of boron on growth, and chlorophyll and mineral contents of shoots. *Biol. Plant.* 48(4), 617-619. Doi: 10.1023/B:BIOP.0000047169.13304.67
- Mukhopadhyay, M., P. Ghosh y T. Mondal. 2013. Effect of boron deficiency on photosynthesis and antioxidant responses of young tea plantlets. *Russ. J. Plant Physiol.* 60(5), 633-639. Doi: 10.1134/S1021443713030096
- Navarro, S. y G. Navarro. 2000. *Química agrícola*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Navarro, S. y G. Navarro. 2014. *Fertilizantes: química y acción*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Okanenko, A. y B. Berstein. 1969. Potassium, photosynthesis and phosphate metabolism in sugar-beet. *Naukova Dumka, Kiev, Ucrania*.
- Olivia, M., N. de Barros y M. de Mouza. 1995. Muerte apical en eucalipto y manejo nutritivo de plantaciones forestales: aspectos fisiológicos del problema. *Bosque* 16(1), 77-86. Doi: 10.4206/bosque.1995.v16n1-08
- Papadakis, I., N. Dimassi, A. Bosabalidis, L. Therios, A. Patakas y A. Giannakoula. 2004. Boron toxicity in Clementine mandarin plants on two rootstocks. *Plant Sci.* 166, 539-547. Doi: 10.1016/j.plantsci.2003.10.027
- Percival, G. 2004. Evaluation of physiological tests as predictors of young tree establishment and growth. *J. Arboric.* 30(2), 80-92.
- Pillimue, G., N. Barrera y S. de Cantillo. 1998. Determinación de deficiencias de elementos mayores en plantas de tomate de árbol. *Acta Agron.* 48(3/4), 62-67.
- Quintana, W., E. Pinzón y D. Torres. 2017. Efecto de un fosfato térmico sobre el crecimiento y producción de fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. ICA Cerinza. *Rev. UDCA Act. & Div. Cient.* 20(1), 51-59.
- Qu, C., X. Gong, C. Liu, M. Hong, L. Wang y F. Hong. 2012. Effects of manganese deficiency and added cerium on photochemical efficiency of maize chloroplasts. *Biol. Trace Elem. Res.* 146, 94-100. Doi: 10.1007/s12011-011-9218-3
- Retamales, J. 2005. Fisiología y manejo de la nutrición de boro, potasio y calcio en pomáceas. *Rev. Unifrut* 15, 10-20.
- Ríos, D. y R. Tafur. 2003. Variedades de aguacate para el trópico: caso Colombia. pp. 143-147. En: *Actas, V Congreso Mundial del Aguacate*. Granada, Málaga, España.
- Roosta, H., A. Estaji y F. Niknam. 2017. Effect of iron, zinc and manganese shortage-induced change on photosynthetic pigments, some osmoregulators and



- chlorophyll fluorescence parameters in lettuce. *Photosynthetica* 55(10), 1-10.
- Saeed, M., M. Ashraf, M. Shahbaz y A. Aisha. 2009. Growth and photosynthesis of salt-stressed sunflower (*Helianthus annuus*) foliar applied different potassium salts. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172(6), 884-893. Doi: 10.1002/jpln.200900102
- Salazar, S., L. Cossio y I. González. 2009. La fertilización de sitio específico mejoró la productividad del aguacate 'Hass' en huertos sin riego. *Agric. Téc. Mex.* 35(4), 439-448.
- Salazar-García, S. 2002. Nutrición del aguacate, principios y aplicaciones. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP); Instituto de la Potasa y el Fósforo (INPOFOS), Querétaro, México.
- Salazar, S. y I. Lazcano. 2003. Site-specific fertilization increased yield and fruit size in 'hass' avocado. *Better Crops Int.* 17(1), 13-15.
- Salas, R. 2002. Herramientas de diagnóstico para definir recomendaciones de fertilización foliar. Centro de Investigaciones Agronómicas, San José, Costa Rica.
- Shani, U., L. Dudley y R. Hanks. 1992. Model of boron movement in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56(5), 1365-1370. Doi: 10.2136/sssaj1992.03615995005600050006x
- Sharma, P. y T. Ramchandra. 1990. Water relations and photosynthesis in mustard plants subjected to boron deficiency. *Indian J. Plant Physiol.* 33, 150-154.
- Sierra, C. 2003. Fertilización de cultivos y frutales en la zona norte. Boletín INIA No. 97. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, La Serena, Chile.
- Sindoni, M., J. Zamora y R. Ramírez. 1994. Síntomas de deficiencia de boro y producción de materia seca en ajonjolí. *Agron. Trop.* 44(1), 135-150.
- Singh, S., G. Badgujar y V. Reddy. 2013. Carbon dioxide diffusion across stomata and mesophyll and photo-biochemical processes as affected by growth CO<sub>2</sub> and phosphorus nutrition in cotton. *J. Plant Physiol.* 170, 801-813. Doi: 10.1016/j.jplph.2013.01.001
- Singh, S. y V. Reddy. 2015. Response of carbon assimilation and chlorophyll fluorescence to soybean leaf phosphorus across CO<sub>2</sub>: Alternative electron sink, nutrient efficiency and critical concentration. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 151, 276-284. Doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.08.021
- Singh, S., V. Reddy, D. Fleisher y D. Timlin. 2017. Relationship between photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence in soybean under varying phosphorus nutrition at ambient and elevated CO<sub>2</sub>. *Photosynthetica* 55(3), 421-433. Doi: 10.1007/s11099-016-0657-0
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2010. *Plant physiology*. 5a ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Tang, Z., J. Zhang, M. Wei, X. Chen, Z. Liu, H. Li e Y. Ding. 2015. Physiological response to potassium deficiency in three sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.) genotypes differing in potassium utilization efficiency. *Acta Physiol. Plant.* 37(184), 1-10. Doi: 10.1007/s11738-015-1901-0
- Veronica, N., D. Subrahmanyam, T. Vishnu, P. Yugandhar, V. Bhadana, V. Padma, G. Jayasree y S. Voleti. 2017. Influence of low phosphorus concentration on leaf photosynthetic characteristics and antioxidant response of rice genotypes. *Photosynthetica* 55(2), 285-293. Doi: 10.1007/s11099-016-0640-4
- Wild, A. y J. Jones. 1992. Nutrición mineral de las plantas cultivadas. pp. 73-119. En: Wild, A. (ed.). *Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russel*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Yabrudy, J. 2012. El aguacate en Colombia: Estudio de caso de los Montes de María, en el Caribe colombiano. Documentos de Trabajo sobre Economía Regional y Urbana 171. Banco de la República, Bogotá, Colombia.
- Yuan, H., J. Yanyan, A. Muhammad, C. Chen, L. Li, L. Zhen, K. Qiusheng, C. Fei y B. Zhilong. 2016. Improving magnesium uptake, photosynthesis and antioxidant enzyme activities of watermelon by grafting onto pumpkin rootstock under low magnesium. *Plant Soil* 409, 229-246. Doi: 10.1007/s11104-016-2965-3
- Zhao, D., D. Oosterhuis y C. Bednarz. 2001. Influence of potassium deficiency on photosynthesis, chlorophyll content, and chloroplast ultrastructure of cotton plants. *Photosynthetica* 39(1), 103-109. Doi: 10.1023/A:1012404204910

# Efecto del tipo de corte y tipo de envase en la conservación de piña [*Ananas comosus* (L.) Merr.] 'Oro Miel' mínimamente procesada

Effect of cutting and packaging type on the conservation of fresh-cut 'Golden' pineapple fruit [*Ananas comosus* (L.) Merr.]

ELKIN MAURICIO BUITRAGO-DUEÑAS<sup>1</sup>  
SAUL DUSSÁN-SARRIA<sup>1,2</sup>  
MARÍA CAMILA RIVERA-OCHOA<sup>1</sup>  
LUIS EDUARDO ORDOÑEZ-SANTOS<sup>1</sup>



Fruto de piña, variedad Oro Miel.

Foto: S. Dussán-Sarria.

## RESUMEN

La piña es un fruto tropical apreciado en el mundo por su sabor, textura y color, y es apropiado para el procesamiento mínimo. Esta investigación tuvo como objetivo determinar el efecto del tipo de corte y tipo de envase de piña mínimamente procesada sobre sus atributos de calidad durante la refrigeración a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  y 85-90% de humedad relativa. Durante el almacenamiento refrigerado fueron monitoreados el color, textura y aceptación sensorial durante 12 días. Las muestras se analizaron estadísticamente mediante un diseño factorial por parcelas subsubdivididas completamente al azar. Los factores a evaluar fueron tres tipos de cortes y tres diferentes empaques y las variables de respuesta los atributos de calidad. Todas las mediciones fueron realizadas con tres repeticiones. Se aplicó estadística descriptiva, ANOVA y comparación de medias según Duncan. En general, tanto el tipo de corte como el tipo de empaque afectan los atributos de calidad de la piña 'Oro Miel' durante el almacenamiento. La condición más adecuada de conservación fue piña cortada en cuartos rodajas y envasada al vacío alcanzando 12 días de almacenamiento.

**Palabras clave adicionales:** calidad, cuarta gama, envasado al vacío, almacenamiento refrigerado.

<sup>1</sup> Facultad de Ingeniería y Administración, Universidad Nacional de Colombia, Palmira (Colombia). ORCID Buitrago-Dueñas, E.M.: 0000-0001-6950-8820; ORCID Dussán-Sarria, S.: 0000-0001-9297-0781; ORCID Rivera-Ochoa, M.C.: 0000-0002-2348-6854; ORCID Ordoñez-Santos, L.E.: 0000-0002-8958-027X

<sup>2</sup> Autor para correspondencia. [sdussan@unal.edu.co](mailto:sdussan@unal.edu.co)



## ABSTRACT

Pineapple is a tropical fruit appreciated worldwide for its flavor, texture and color, and is suitable for minimal processing. The objective of this research was to determine the effect of the cut type and type of container for minimally processed pineapple on quality attributes during refrigeration at  $5\pm 1^{\circ}\text{C}$  and 85-90% relative humidity. During the refrigerated storage, the color, texture and sensorial acceptance were monitored for 12 days. The samples were analyzed statistically by means of a factorial design using completely random subdivided plots. The evaluated factors included three cut types and three types of packaging, and the evaluated response variables included quality attributes. All measurements were taken in triplicate. Descriptive statistics, ANOVA and means comparison using Duncan test were used. In general, both the cut type and the type of packaging affected the quality attributes of the 'Golden' pineapple during storage. The best preservation condition was pineapple cut into quarter slices and vacuum-packed, reaching 12 days of storage.

**Additional key words:** quality, fourth range, vacuum packaging, refrigerated storage.

Fecha de recepción: 06-11-2017 Aprobado para publicación: 30-05-2018

## INTRODUCCIÓN

La piña [*Ananas comosus* (L.) Merr.] es una de las frutas tropicales de mayor producción en el mundo después del banano y los cítricos (Uriza-Ávila, 2005). De acuerdo con Alarcón y Sánchez (2012), la mayor producción de piña, a nivel mundial, se encuentra en Asia, América y África, lo que ha permitido el abastecimiento mundial de la fruta. En Colombia la piña es una fruta de importancia económica, se encuentra entre las 15 frutas más consumidas en el país y según cifras del DANE (2015), Colombia exportó alrededor de US\$ 2,25 millones en un reglón de la agricultura en crecimiento. La variedad MD2 originaria de Hawái e identificada en Colombia como piña 'Oro Miel', es la más conocida a nivel mundial, posee una forma cilíndrica, simétrica y uniforme, pericarpio entre color amarillo-naranja, pulpa de color amarillo intenso, dulce, compacta, con un peso promedio de 1,3 a 2,5 kg, presenta un alto contenido de azúcares, vitamina C y bajo contenido de acidez en comparación con otras variedades (Chan *et al.*, 2003). La piña mínimamente procesada cuenta actualmente con un mercado en crecimiento, ya que proveen al consumidor un alimento listo para consumir con beneficios para la salud (Escobar *et al.*, 2014). Sin embargo, este tipo de producto tiene una vida útil de sólo 5-7 d a  $1-7^{\circ}\text{C}$ , principalmente por procesos de degradación fisiológicos y microbianos (Pan *et al.*, 2015).

Por lo tanto, si se logra inhibir la degradación fisiológica y microbiológica de la piña mínimamente procesada, es posible extender la vida útil de este tipo de productos. Dussán-Sarria *et al.* (2014) afirman que, si se aplican técnicas combinadas sinérgicamente, el crecimiento microbiano y las reacciones físicas, químicas y bioquímicas serían reducidas en los tejidos vegetales. En el procesamiento mínimo de piña el tipo de corte y el tipo de envase utilizado tiene una repercusión directa en la fisiología y mantenimiento de la calidad del producto vegetal. Se utilizan técnicas que se combinan sinérgicamente limitando el crecimiento microbiano y el metabolismo del producto. Algunas de estas técnicas son el enfriamiento rápido, la refrigeración, la atmósfera modificada y recubrimientos comestibles (Montero-Calderón *et al.*, 2008; Sanjinez-Argandoña *et al.*, 2010; Dussán-Sarria *et al.*, 2014). Sin embargo, la calidad de la piña mínimamente procesada variedad MD2 cultivada en Colombia, no ha sido evaluada a pesar del potencial agroindustrial que esta fruta cuenta en el suroccidente colombiano.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del tipo de corte y envase apropiado para mantener la resistencia a la penetración, color y aceptación sensorial de la piña mínimamente procesada bajo condiciones de almacenamiento refrigerado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materia de estudio

Los frutos de piña variedad Oro Miel, destinados para la investigación, se adquirieron en Oriente S.A., cultivados en el corregimiento Barrancas de Palmira, Valle del Cauca (temperatura 23°C, 1.000 msnm, 40% HR). Luego de pruebas preliminares físico-químicas y sensoriales, se seleccionó el grado de madurez 3 (Icontec, 1996), como el adecuado para el procesamiento mínimo. Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Tecnología de Frutas y Hortalizas de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

### Procesamiento mínimo

Piñas enteras con grado de madurez 3 fueron lavadas con agua potable y desinfectadas en solución hipoclorito de sodio ( $100 \mu\text{L L}^{-1}$ ) durante 10 min de inmersión (Sothornvit y Rodsamran, 2008). Los frutos fueron almacenados a 10°C por 12 h previo al procesamiento. Al día siguiente, manualmente fueron retirados las coronas, epicarpio y corazones. A la pulpa se le realizaron tres tipos de corte: cuartos de rodajas ( $6 \times 2 \times 4$  cm), cubos ( $2 \times 2 \times 2$  cm) y julianas ( $6 \times 2 \times 2$  cm). Posteriormente los cortes fueron inmersos en solución de hipoclorito de sodio a  $20 \mu\text{L L}^{-1}$  por 2 min para retirar impurezas en pulpa y se retiró el exceso de agua por gravedad durante 2 min. Los cortes del fruto más homogéneos fueron seleccionados y sumergidos en solución de cloruro de calcio  $\text{CaCl}_2$  al 1% (v/v), ácido cítrico al 1% (v/v), ácido ascórbico al 1% (v/v) con el fin de conservar la estructura y evitar la oxidación enzimática (Robles-Sánchez *et al.*, 2013; Dussán-Sarria *et al.*, 2014).

Los cortes fueron sometidos a centrifugación a 2.800 rpm durante 15 s para eliminar el exceso de humedad. Posteriormente se acondicionaron 150 g de cada corte en tres tipos de empaque (Tab. 1).

Los frutos empacados fueron almacenados a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  y 85-90% de HR según recomienda Silva *et al.* (2005). Los tratamientos evaluados fueron de la siguiente manera: CR-PET: cuartos de rodaja en cajas de polietileno tereftalato (PET); C-PET: cubos en PET; J-PET: julianas en PET; CR-Poliestireno o PVC: cuartos de rodaja en bandeja de poliestireno; C-Poliestireno o PVC: cubos en bandeja de poliestireno; J-Poliestireno o PVC: julianas en bandejas de poliestireno; CR-Bolsa Vacío: cuartos de rodaja en bolsa de vacío, C-Bolsa Vacío: cubos en bolsa de vacío, J-Bolsa Vacío: julianas en bolsa de vacío. Durante el almacenamiento refrigerado, cada 3 d durante 12 d se determinaron los parámetros que se describen a continuación.

### Color

El color del fruto fue evaluado mediante las coordenadas CIELab ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), usando un colorímetro Kónica Minolta CR-410 (Tokio, Japón). De estas determinaciones y debido a las características particulares de la piña se analizó la coordenada  $L^*$  que representa el brillo o luminosidad el cual aumenta a mayores valores de  $L^*$  (cromaticidad (-) verde a (+) rojo) y  $b^*$  (cromaticidad (-) azul a (+) amarillo).

### Resistencia a la penetración

Se empleó el texturómetro Shimadzu EZ-500 (Kyoto, Japón) para evaluar la fuerza de penetración en Newton (N) con una célula de carga de 500 N, un cilindro de prueba de 8 mm de diámetro y 60 mm de largo, y una velocidad de ensayo de  $10 \text{ mm min}^{-1}$ . El pico máximo durante los ensayos fue tomado como la resistencia a la penetración (Rocculi *et al.*, 2009).

### Análisis sensorial

El análisis sensorial fue realizado utilizando la metodología prueba de satisfacción de escala hedónica,

**Tabla 1. Tipos de envases utilizados para el almacenamiento de piña 'Oro miel' mínimamente procesada con sus propiedades de permeabilidad.**

Envase utilizado	Propiedades
Bandeja de poliestireno cubierta con policloruro de vinilo ( $10 \times 10$ cm)	PVC calibre $14 \mu\text{m}$ , permeabilidad al $\text{CO}_2$ de $5.183$ y al $\text{O}_2$ de $14.803 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$
Bolsa de polietileno de baja densidad. Espesor $70 \mu\text{m}$ (PEBD, $15 \times 20$ cm)	Permeabilidad al $\text{CO}_2$ de $112 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ y al $\text{O}_2$ de $3.940 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$
Cajas de polietileno tereftalato (PET) ( $11 \times 9 \times 2,5$ cm)	Permeabilidad al $\text{CO}_2$ de $112 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ y al $\text{O}_2$ de $3.940 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$

siguiendo lo propuesto por Peryamm y Pilgrim (Lim, 2011). El análisis se realizó en los días 0, 10 y 12 de almacenamiento con un grupo de 30 panelistas no entrenados los cuales analizaron el sabor y la apariencia general de los cortes de fruto. Fue utilizada la escala hedónica afectiva de 5 puntos que define el grado de satisfacción así: 1 = no me gusta, 2 = me disgusta ligeramente, 3 = ni me gusta ni me disgusta, 4 = me gusta ligeramente, 5 = me gusta mucho. Los cortes se consideraron sensorialmente aceptables con notas iguales o superiores a 3.

### Análisis microbiológico

Fueron analizados las cantidades presentes o ausentes de microorganismos aerobios mesófilos según la NTC 4519 (Icontec, 2009a), coliformes totales según la NTC 4516 (Icontec, 2009b), coliformes fecales según Invima (1998a) y recuento de mohos junto a levaduras según Invima (1998b). Los análisis fueron realizados en los días 0, 10, 12 y 15 de almacenamiento.

### Análisis estadístico

Las muestras se analizaron estadísticamente mediante un diseño factorial por parcelas subdivididas completamente al azar. Se realizó un análisis de varianza y comparación de medias utilizando la prueba de rango múltiple de Duncan ( $P \leq 0,05$ ). Los datos fueron analizados usando el software estadístico SAS® v. 9.1. Los factores a evaluar fueron los tres tipos de cortes y los tres tipos de empaques.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontró un descenso en la aceptación sensorial para todos los tipos de cortes y empaques evaluados (Tab. 2; Figs. 1, 2, 3, 4 y 5). En general la piña en cuartos de rodaja empacada al vacío presentó las mejores notas sensoriales de aceptación durante todo el almacenamiento refrigerado. El aroma (Fig. 2) fue uno de los parámetros más afectados sensorialmente durante el almacenamiento, autores como Torri *et al.* (2010) afirman que la piña mínimamente procesada pierde el aroma a fruta fresca, por la disminución de compuestos como los aromáticos-alifáticos, aldehídos, cetonas y compuestos menos polares, en contraste con el incremento de los compuestos que dan aroma desagradable como los azufrados, polares, alcoholes, cetonas

y terpenos a medida que avanza el almacenamiento. De igual forma sucedió con el sabor (Fig. 3), puesto que por las reacciones enzimáticas que se desarrollan en el fruto, desarrollan sabor a fermentando según el perfil de compuestos volátiles para piña cortada y almacenada bajo refrigeración como mencionan Spanier *et al.* (1998). La degradación de la textura (Fig. 4) se vio afectada por la pérdida de agua en la pulpa, autores como Escobar (2014), considera que la pérdida de textura en frutas y vegetales mínimamente procesados se asocia al deterioro fisiológico de peso que probablemente surge de la plasmólisis de las células vegetales y la disminución del color (Fig. 1) en los días 6 y 9 de almacenamiento (Fig. 5). La evidencia de la degradación de la textura de la pulpa se observó en la pérdida de apariencia general de la pulpa durante todo el almacenamiento (Fig. 5). Según Antonioli *et al.* (2012), la piña mínimamente procesada puede conservar sus características de fruta fresca hasta el día 6 de almacenamiento, después de ahí puede desarrollar olor desagradable y sabor a fruta fermentada.

En relación con los empaques, seguramente la utilización de la caja PET no fue lo suficientemente hermética y la bandeja de icopor con PVC (tratamiento Poliestireno) presenta una alta permeabilidad a los gases, principalmente por parte del icopor, lo que significó una atmósfera modificada incompleta produciendo alteraciones sensoriales, de firmeza y color en la piña mínimamente procesada. Por su parte el vacío proporcionado por el PEBD de 70  $\mu\text{m}$  (tratamiento Bolsa Vacío), fue suficiente para evitar intercambios gaseosos con el producto, que produjeran alteraciones significativas durante el periodo de almacenamiento evaluado.

Considerando el empaque al vacío como el mejor aceptado sensorialmente, en valores de firmeza y color, y de acuerdo con las notas sensoriales encontradas en el atributo de aceptación general de piña cortada, se sugiere que el corte en cuartos de rodaja (CR) es el preferido por los panelistas.

Durante el procesamiento mínimo de la piña, suceden diferentes operaciones unitarias como selección, lavado, pelado, higienización, centrifugación y empaque, y el producto continúa con el proceso metabólico de maduración, favoreciendo en muchas ocasiones la proliferación de microorganismos (Rangel y López, 2012). En el día 0 de almacenamiento no hubo presencia de microorganismos tipo aerobios mesófilos, coliformes totales, coliformes fecales, ni mohos y

**Tabla 2. Valores de notas sensoriales de piña 'Oro Miel' mínimamente procesada con 30 panelistas no entrenados y una escala hedónica de 5 puntos.**

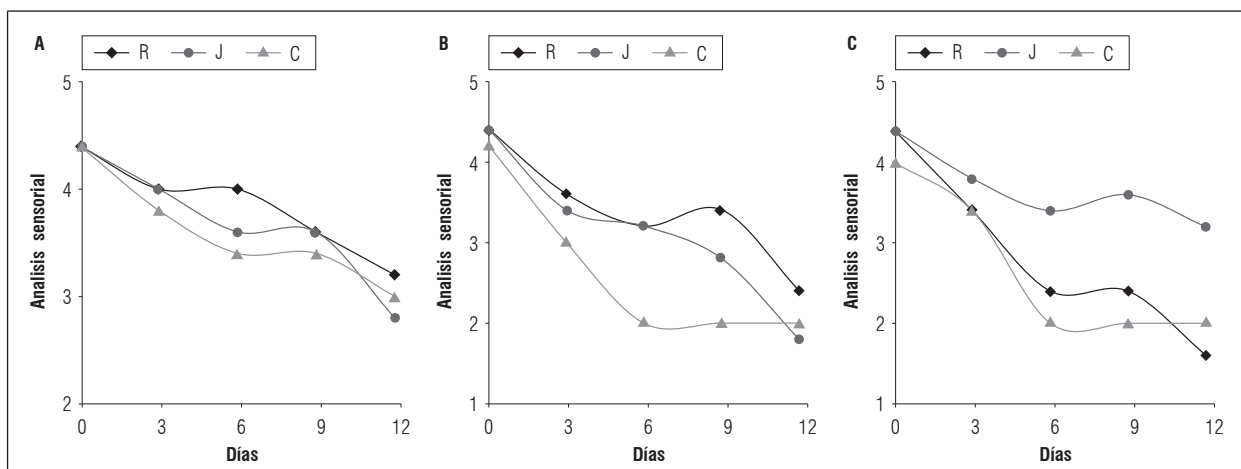
Tratamiento	Días	Variables de respuesta (tratamiento corte-empaque)		
		Efecto del aroma	Efecto del sabor	Aceptación general
CR-PET	0	4,2±0,84	4,4±0,55	4,4±0,54
	10	2,8±0,84	4,0±0,70	3,6±0,54
	12	2,4±0,9	2,8±1,30	3,2±0,45
C-PET	0	4,4±0,9	4,6±0,55	4,2±0,45
	10	2,8±0,45	3,0±0,22	3,2±0,84
	12	2,2±0,84	2,6±0,55	2,8±0,84
J-PET	0	4,4±0,55	4,6±0,55	4,2±0,45
	10	2,4±1,14	2,0±1,0	2,0±1,0
	12	1,6±0,90	2,0±1,00	1,8±1,1
CR-poliestireno	0	4,4±0,55	4,2±0,45	4,2±0,45
	10	2,4±0,9	3,8±1,1	3,6±0,90
	12	1,8±0,45	2,0±1,0	2,2±0,45
C-poliestireno	0	4,2±0,4	4,2±0,84	4,0±0,70
	10	2,6±0,9	3,0±1,58	2,8±0,84
	12	1,6±0,55	1,4±0,89	1,8±0,45
J-poliestireno	0	4,8±0,45	4,4±0,55	4,2±0,45
	10	2,8±0,84	3,2±0,84	3,2±0,84
	12	2,0±1,22	2,0±1,0	2,2±0,84
CR-BolsaVacío	0	4,6±0,55	4,0±0,70	4,2±0,45
	10	3,9±1,41	3,9±0,84	3,6±0,55
	12	3,6±1,14	3,6±0,55	3,6±0,45
C-BolsaVacío	0	4,2±0,84	4,2±0,45	4,2±0,45
	10	3,8±0,84	4,0±0,70	3,8±0,45
	12	3,6±0,55	3,2±0,44	3,2±0,84
J-BolsaVacío	0	4,2±0,45	4,2±0,45	4,2±0,45
	10	4,0±0,70	3,6±0,89	3,8±0,45
	12	3,8±0,45	3,6±0,89	3,2±0,54
ANOVA				
Tiempo (T)		***	***	***
Tratamiento corte-empaque		NS	NS	*

Promedios ± desviación estándar; (\*) significativo  $P \leq 0,05$ ; (\*\*) significativo  $P \leq 0,01$ ; (\*\*\*) significativo  $P \leq 0,001$ .

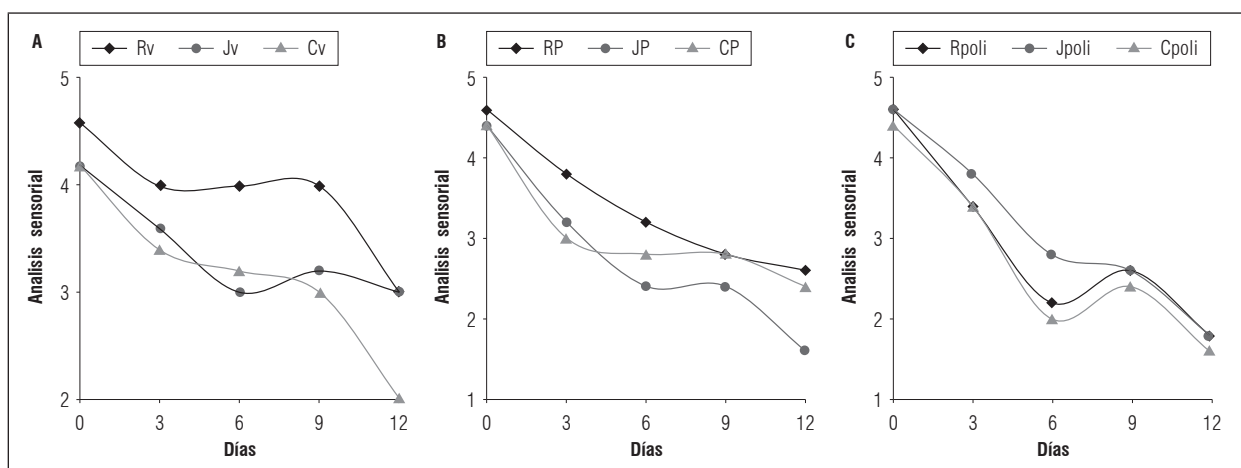
CR: cuartos de rodaja; C: cubos; J: julianas; PET: cajas de polietileno tereftalato; poliestireno: bandeja de poliestireno y cubierta policloruro de vinilo; Bolsa Vacío: bolsa de polietileno de baja densidad al vacío.

levaduras. En el día 12 de almacenamiento se observó formación de colonias de algunos microorganismos, sin embargo, los recuentos fueron inferiores a los tolerables a la salud humana según la Resolución 3929 (Ministerio de Salud y Protección Social en Colombia,

2013) y De Pablo y Moragas (2008). En el día 15 de almacenamiento el recuento de todos los grupos de microorganismos cuantificados sobrepasó los umbrales aceptados por el Invima en alimentos destinados para consumo humano.



**Figura 1.** Evaluación de la aceptación sensorial del color en piña 'Oro Miel' mínimamente procesada con 30 panelistas no entrenados y una escala hedónica de 5 puntos. A. Envase de bolsa de vacío; B. Envase de PVC o poliestireno; C. Envase en PET; R. Cuartos de rodaja; J. Julianas; C. Cubos.



**Figura 2.** Evaluación de la aceptación sensorial del aroma en piña 'Oro Miel' mínimamente procesada con 30 panelistas no entrenados y una escala hedónica de 5 puntos. A. Envase de bolsa de vacío (v); B. Envase de PVC o poliestireno (P); C. Envase en PET o polietileno tereftalato (poli); R. Cuartos de rodaja; J. Julianas; C. Cubos.

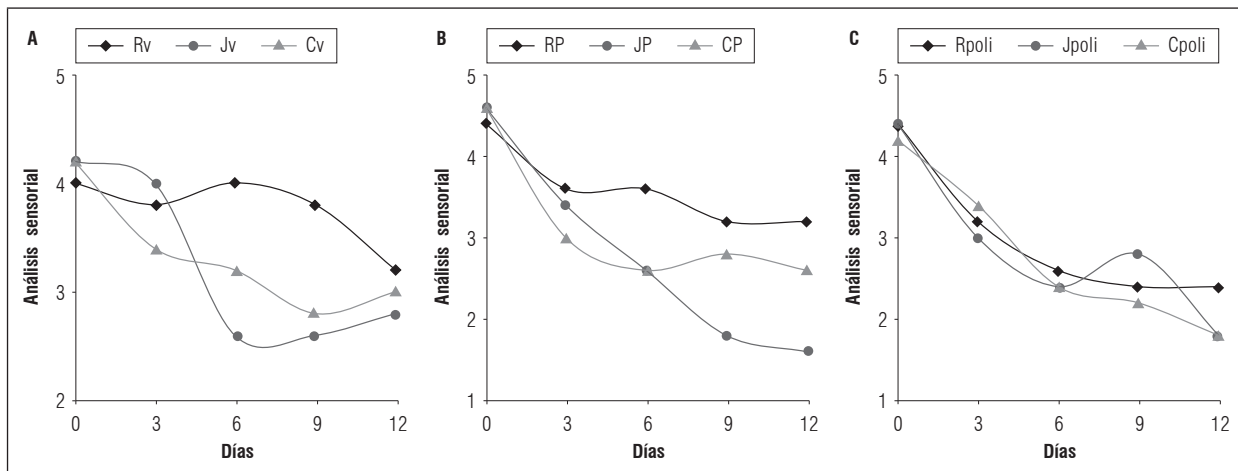
### Resistencia a la penetración

La tabla 3 presenta los resultados obtenidos para firmeza, es posible observar que no existe diferencia estadística respecto al tipo de corte ni tipo de empaque. Los tratamientos con empaque al vacío exhibieron presencia de líquido exudado, sin embargo por ser un valor inferior al 1% no se consideró representativo. La pérdida de firmeza está relacionada directamente con una pérdida de agua debido a la degradación de membranas durante el almacenamiento bajo refrigeración (Portela y Cantwell, 2001; Escobar *et al.*, 2014). Resultados similares reportan Santos *et al.* (2005), los

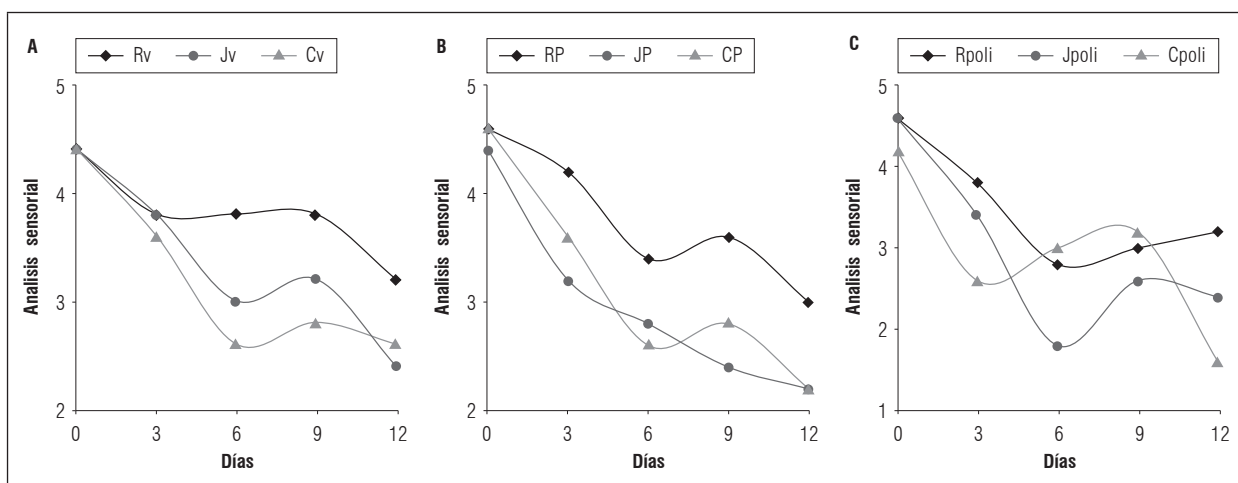
autores asocian este ablandamiento, con la degradación de las pectinas asociada a la acción de las enzimas pectinametilesterasa y poligalacturonasa. De acuerdo con Toivonen y Brummell (2008), el ablandamiento de los tejidos vegetales es uno de los mayores problemas que limitan la vida útil de los frutos mínimamente procesados, y la firmeza es un factor importante que influencia la aceptabilidad del consumidor de ese tipo de productos (Rojas-Graü *et al.*, 2008).

La pérdida de líquido exudado de productos vegetales frescos se debe a la pérdida de agua originada por el proceso de transpiración influenciado por la diferencia





**Figura 3. Evaluación de la aceptación sensorial del sabor en piña 'Oro Miel' mínimamente procesada con 30 panelistas no entrenados y una escala hedónica de 5 puntos. A. Envase de bolsa de vacío (v); B. Envase de PVC o poliestireno (P); C. Envase en PET o polietileno tereftalato (poli); R. Cuartos de rodaja, J. Julianas, C. Cubos.**



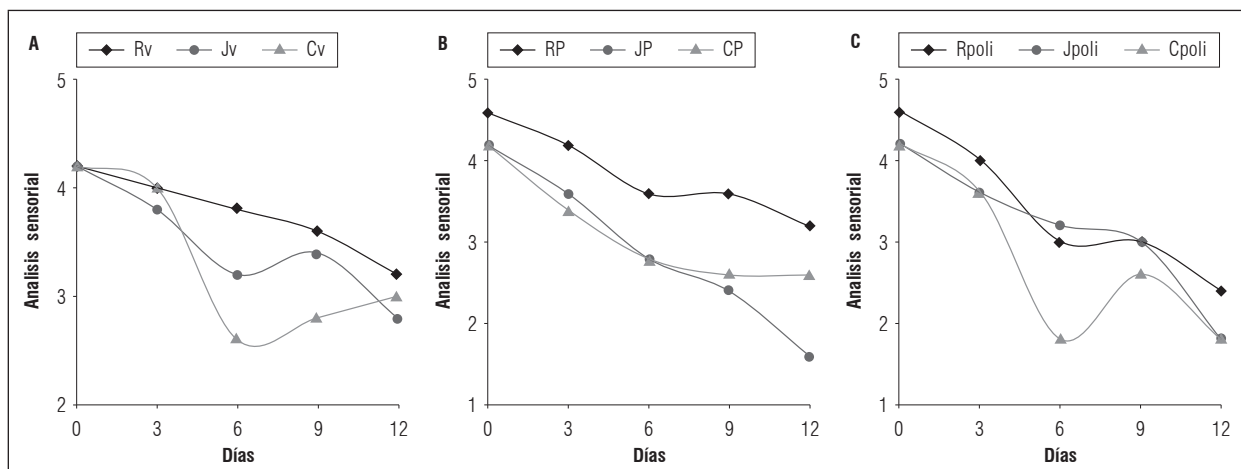
**Figura 4. Evaluación de la aceptación sensorial de la textura en piña 'Oro Miel' mínimamente procesada con 30 panelistas no entrenados y una escala hedónica de 5 puntos. A. Envase de bolsa de vacío (v); B. Envase de PVC o poliestireno (P); C. Envase en PET o polietileno tereftalato (poli); R. Cuartos de rodaja; J. Julianas; C. Cubos.**

de presión de vapor entre la muestra de fruto y el ambiente de refrigeración. La pérdida de líquido se hace más evidente en productos frescos cortados (Kader, 2002; Barreiro y Sandoval, 2006). Los leves cambios en los valores de los parámetros físico-químicos explican el comportamiento típico de vegetales no climáticos como la piña (Kader, 2002).

### Color

En la tabla 4 se observan los valores de  $L^*$  o luminosidad. La piña en cubos presentó los mayores valores

de luminosidad, seguida de la piña en julianas y por último la piña en cuartos de rodaja. La disminución de  $L^*$  en frutas mínimamente procesadas se asocia a pardeamiento por la acción de la enzima polifenoloxidasas, pérdida gradual de agua o deshidratación superficial (Pérez *et al.*, 2016; Djioua *et al.*, 2010). Resultados similares reportaron Chitarra y Da Silva (1999) y Sarzi y Durigan (2002) en piña Perola, almacenada a 9°C durante 12 d. El cierto grado de pérdida de luminosidad de la piña puede ser indicativo de mejor aceptación por el consumidor por asociarse a mejor sabor y succulencia (Sarzi y Durigan, 2002).



**Figura 5.** Evaluación de la apariencia general en piña 'Oro Miel' mínimamente procesada a través de la aceptación sensorial con 30 panelistas no entrenados y una escala hedónica de 5 puntos. A. Envase de bolsa de vacío (v); B. Envase de PVC o poliestireno (P); C. Envase en PET o polietileno tereftalato (poli); R. Cuartos de rodaja; J. Julianas; C. Cubos.

**Tabla 3.** Análisis comparativo del efecto del tipo de corte y envase sobre los valores de firmeza y líquido exudado de piña 'Oro Miel' mínimamente procesada para el día 12 de almacenamiento.

Muestra	Firmeza (N)	Líquido exudado (%)
C-PVC	8,38±2,0	0±0
C- PET	7,48±2,1	0±0
C- Vacío	6,61±2,8	0±0
J-PVC	9,76±2,6	0±0
J-PET	9,40±1,4	0±0
J- Vacío	7,48±1,1	0±0
CR-PVC	9,47±2,4	0,10±2,8
CR-PET	8,69±5,3	0,33±2,7
CR-Vacío	8,52±2,3	0,96±2,9

Promedios ± desviación estándar.

Promedios con letras distintas, en una misma columna, indican diferencia significativa según la prueba de rango múltiple de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

C: corte en cubos; J: corte en julianas; CR: corte en cuartos de rodajas; PVC: bandejas de poliestireno cubierta con policloruro de vinilo; PET: cajas de polietileno tereftalato; Vacío: bolsa de polietileno de baja densidad al vacío.

Para la coordenada cromática  $a^*$  que se ubicó entre los valores negativos que indican verde, no presentó diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre los envases pero sí entre los cortes. Puede estar asociada a las diferencias naturales del color dentro de un mismo fruto (Sarzi y Durigan, 2002).

Montero-Calderón *et al.* (2008) observaron igualmente una reducción del 22% en los valores de la coordenada  $L^*$  en piña mínimamente procesada con

**Tabla 4.** Análisis comparativo del efecto del tipo de corte y envase sobre el color en piña 'Oro Miel' mínimamente procesada para el día 12 de almacenamiento.

Muestra	L	$a^*$	$b^*$
C-PVC	60,06±4,1 ac	-2,05±1,2 a	29,93±2,8 c
C- PET	61,32±4,3 bc	-2,25±0,9 a	29,61±2,1 cb
C- Vacío	57,22±4,4 c	-1,85±0,6 a	30,17±2,3 cb
J-PVC	57,60±6,1 ab	-1,71±1,7 b	29,09±1,7 b
J-PET	59,61±5,4 b	-1,94±0,7 b	27,09±2,5 bc
J- Vacío	55,17±3,5 c	-1,43±0,7 b	28,11±2,7 b
CR-PVC	47,72±3,1 ab	-3,13±1 c	26,08±3,1 ba
CR-PET	46,42±3,2 ac	-2,91±0,9 c	24,30±2,2 a
CR-Vacío	49,18±2,9 ca	-3,53±0,6 c	27,52±2,1 cb

Promedios ± desviación estándar.

Promedios con letras distintas, en una misma columna, indican diferencia significativa según la prueba de rango múltiple de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

C: corte en cubos; J: corte en julianas; R: corte en cuartos de rodajas; PVC: bandejas de poliestireno cubierta con policloruro de vinilo; PET: cajas de polietileno tereftalato; Vacío: bolsa de polietileno de baja densidad al vacío.

recubrimiento comestible de alginato de sodio y adición de cloruro de calcio a 20 d de almacenamiento a 5°C. González-Aguilar *et al.* (2004) también observaron una disminución significativa de las coordenadas de color  $L^*$  durante 14 d de almacenamiento de rodajas de piña tratadas con ácido ascórbico (0,05%).

De acuerdo con Antonioli *et al.* (2003), el cloruro de calcio aplicado en trozos de piña resultó en descenso de los valores de la coordenada  $L^*$  indicando cierto

oscurecimiento de las muestras. Por otro lado, Meléndez-Martínez, *et al.* (2004) afirman que la adición de antioxidantes, evita la disminución de la luminosidad de piña durante el procesamiento y almacenamiento.

La disminución de los valores de la coordenada  $b^*$  corresponden a un cambio de tonalidad amarillo a una tonalidad más oscura en la piña mínimamente procesada, esto debido a la degradación de carotenoides asociados a la coloración amarilla. Considerando un mismo tipo de corte, la piña acondicionada al vacío exhibió los mayores valores de  $b^*$ , esto se atribuye a la exclusión del oxígeno, contribuyendo a que los carotenoides no presentaran degradación alguna y por tal motivo se mantuviera el color característico de la piña.

## CONCLUSIONES

La piña ‘Oro Miel’, mínimamente procesada, presenta alteraciones físico-químicas y cambios sensoriales durante el almacenamiento refrigerado por efecto del tipo de corte y tipo de empaque.

De acuerdo a las características de calidad evaluadas para cada tipo de corte y empaque y la evaluación sensorial, es posible establecer que la piña variedad Oro Miel mínimamente procesada, es aceptable para el consumidor hasta el día 12 de almacenamiento.

El tipo de corte y empaque que conserva mejor las características de calidad de la piña Oro Miel mínimamente procesada y que presentó mejor aceptabilidad, corresponde al corte en cuartos de rodajas empacado al vacío.

**Conflicto de intereses:** el manuscrito fue preparado y revisado con la participación de los autores, quienes declaran no tener algún conflicto de interés que coloquen en riesgo la validez de los resultados aquí presentados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alarcón M. y P. Sánchez 2012. Estudio de factibilidad para la implementación de una fábrica dedicada a la elaboración de jugos de piña que ayude a rescatar el cultivo de esta fruta en la zona del Milagro. Trabajo de grado. Facultad Ciencias Administrativas y Comerciales, Universidad Estatal de Milagro, San Francisco de Milagro, Ecuador.

Antionioli, L., B.C. Benedito y S.M. Sousa Filho. 2003. Efeito do cloreto de cálcio na qualidade de abacaxi “Pérola” mínimamente procesado. *Pesq. Agrop. Bras.* 38(9), 1105-1110. Doi: 10.1590/S0100-204X2003000900012

Barreiro, J. y A. Sandoval. 2006. Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas. Universidad Simón Bolívar; Editorial Equinoccio, Caracas, Venezuela.

Chan, Y.K., G.C. d’Eeckenbrugge y G.M. Sanewski. 2003. Breeding and variety improvement. pp. 33-56. En: Bartholomew, D.P., R.E. Paull, y K.G. Rohrbach (eds.). *The pineapple: botany, production and uses.* CABI Publishing, Wallingford, UK. Doi: 10.1079/9780851995038.0033

Chitarra, A.B. y J.M. Da Silva. 1999. Effect of modified atmosphere on internal browning of ‘Smooth Cayenne’ pineapples. *Acta Hort.* 485, 85-90. Doi: 10.17660/ActaHortic.1999.485.10

DANE (Departamento Administrativo Nacional de Estadística de Colombia). 2015. Boletín técnico de exportaciones. Bogotá, Colombia.

De Pablo, B. y M. Moragas. 2008. Recopilación de normas microbiológicas de los alimentos y asimilados y otros parámetros físico-químicos de interés sanitario. En: <http://www.euocarne.com/daal?a1=informes&a2=normas-microbiologicas.pdf>; consulta: abril de 2017.

Djioua, T., F. Charles, F. Lopez-Laun, H. Filgueiras, A. Coudret, J. Freire, M. Ducamp-Collin y H. Sallanon. 2010. Improving the storage of minimally processed mangoes (*Mangifera indica* L.) by hot water treatments. *Postharvest Biol. Technol.* 52(2), 221-226. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.10.006

Dussán-Sarria, S., P.M. Reyes-Calvache y J.I. Hleap-Zapata. 2014. Efecto de un recubrimiento comestible y diferentes tipos de empaque en los atributos físico-químicos y sensoriales de piña ‘manzana’ mínimamente procesada. *Inf. Tecnol.* 25(5), 41-46. Doi: 10.4067/S0718-07642014000500007

Escobar, A., C. Márquez, C. Restrepo y L. Pérez. 2014. Aplicación de tecnología de barreras para la conservación de mezclas de vegetales mínimamente procesados. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* 67(1), 7238-7245. Doi: 10.15446/rfnam.v67n1.42652

González-Aguilar, G.A., S. Ruiz-Cruz, R. Cruz-Valenzuela, A. Rodríguez-Félix y C.Y. Wang. 2004. Physiological and quality changes of fresh-cut pineapple treated with antibrowning agents. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 37(3), 369-376. Doi: 10.1016/j.lwt.2003.10.007

Icontec (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación). 1996. Norma Técnica Colombiana NTC 729-1. Frutas frescas. Piña. Especificaciones. Bogotá, Colombia.

- Icontec (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación). 2009a. Norma Técnica Colombiana NTC 4519. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30°C. Bogotá, Colombia.
- Icontec (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación). 2009b. Norma Técnica Colombiana NTC 4516. Microbiología de alimentos y productos de alimentación animal. Método horizontal para la detección y enumeración de coliformes técnica del número más probable. Bogotá, Colombia.
- Invima (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos). 1998a. Manual de técnicas para el análisis de Alimentos: método No. 7. Bogotá, Colombia.
- Invima (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos). 1998b. Manual de Técnicas para el análisis de Alimentos: método No. 14. Bogotá, Colombia.
- Kader, A.A. 2002. Post-harvest technology of horticultural crops. Division of Agriculture and Natural Resources Publication No. 3311, University of California, Oakland, CA, USA.
- Lim, J. 2011. Hedonic scaling: a review of methods and theory. *Food Qual. Prefer.* 22, 733-747. Doi: 10.1016/j.foodqual.2011.05.008
- Meléndez-Martínez, A.J., I.M. Vicario y F.J. Heredia. 2004. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Arch. Latinoam. Nutr.* 54(2), 209-215.
- Ministerio de Salud y Protección Social, Republica de Colombia. 2013. Resolución 3929, reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir las frutas y las bebidas con adición de jugo (zumo) o pulpa de fruta o concentrados de fruta, clarificados o no, o la mezcla de estos que se procesen, empaquen, transporten, importen y comercialicen en el territorio nacional. Diario Oficial No. 48.933. Bogotá, Colombia.
- Montero-Caldérón, M., M.A. Rojas-Graü y O. Martín-Belloso. 2008. Effect of packaging on quality and shelf-life of fresh cut-pineapple (*Ananas comosus*). *Postharvest Biol. Technol.* 50, 182-189. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.03.014
- Pan, Y., J. Zhu y S. Li. 2015. Effects of pure oxygen and reduced oxygen modified atmosphere packaging on the quality and microbial characteristics of fresh-cut pineapple. *Fruits* 70(2), 101-108. Doi: 10.1051/fruits/2015003
- Pérez, A.F., I.D. Aristizábal y J.I. Restrepo. 2016. Conservación de mango Tommy Atkins mínimamente procesado mediante la aplicación de un recubrimiento de aloe vera (*Aloe barbandensis* Miller). *Vitae* 23(1), 65-77. Doi: 10.17533/udea.vitae.v23n1a02
- Portela, S. y M. Cantwell. 2001. Cutting blade sharpness affects appearance and other quality attributes of fresh-cut cantaloupe melon. *J. Food Sci.* 66(9), 1265-1270. Doi: 10.1111/j.1365-2621.2001.tb15199.x
- Rangel, M. y A. López. 2012. Cambios en frutas tropicales frescas, cortadas y empacadas en atmósfera modificada durante su almacenamiento en refrigeración. *Temas Select. Ing. Aliment.* 6(2), 94-109.
- Robles-Sánchez, R., A. Rojas-Graü, I. Odriozola-Serrano, G. González-Aguila y O. Martín-Belloso. 2013. Influence of alginate-based edible coating as carrier of antibrowning agents on bioactive compounds and antioxidant activity in fresh-cut Kent mangoes. *LWT-Food Sci. Technol.* 50(1), 240-246. Doi: 10.1016/j.lwt.2012.05.021
- Rocculi, R., E. Cocci, S. Romani, G. Sacchetti y M. Dalla Rosa. 2009. Effect of 1-MCP treatment and N<sub>2</sub>O MAP on physiological and quality changes of fresh-cut pineapple. *Postharvest Biol. Technol.* 51, 371-377. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.07.010
- Rojas-Graü, M.A., M.S. Tapia y O. Martín-Belloso, 2008. Using polysaccharide-based edible coatings to maintain quality of fresh-cut Fuji apples. *Food Sci. Technol.* 41, 139-147. Doi: 10.1016/j.lwt.2007.01.009
- Sanjinez-Argandoña, E.J., I.G. Branco, S. Takito y J. Corbari. 2010. Influencia de la deshidratación osmótica y de la adición de cloruro de calcio en la conservación de kiwis mínimamente procesados. *Food Sci. Technol.* 30(suppl. 1), 205-209. Doi: 10.1590/S0101-20612010000500031
- Santos, J., E. Valeiro, M. Torre y A. Marquez. 2005. Avaliação da qualidade do Abacaxi 'Pérola' mínimamente processado armazenado sob atmosfera modificada. *Ciênc. Agrotec.* 29(2), 353-361. Doi: 10.1590/S1413-70542005000200012
- Sarzi, B. y J. Durigan. 2002. Avaliação física e química de produtos mínimamente processados de abacaxi- 'pérola'. *Rev. Bras. Frutic.* 24(2), 333-337. Doi: 10.1590/S0100-29452002000200012
- Silva, G.C., G.A. Maia, R. Figueiredo, M. Souza Filho, R. Alves y M. Souza Neto. 2005. Efeito do tipo de corte nas características físico-químicas do abacaxi pérola mínimamente processado. *Food Sci. Technol.* 25(2), 223-228. Doi: 10.1590/S0101-20612005000200006
- Sothornvit, R. y P. Rodsamran. 2008. Effect of a mango film on quality of whole and minimally processed mangoes. *Postharvest Biol. Technol.* 47(3), 407-415. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.08.005
- Spanier, A., M. Flores, C. James, J. Lasater, S. Lloyd y J. Miller. 1998. Fresh-cut pineapple (*Ananas* sp.) flavor. Effect of storage. *Dev. Food Sci.* 40, 331-343. Doi: 10.1016/S0167-4501(98)80057-5
- Toivonen, P.M.A. y D.A. Brummell. 2008. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut

- fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 48, 1-14. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.09.004
- Torri, L., N. Sinelli y S. Limbo. 2010. Shelf life evaluation of fresh-cut pineapple by using an electronic nose. *Postharvest Biol. Technol.* 56(3), 239-245. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2010.01.012
- Uriza-Ávila, D. 2005. Foreword and preface. *Acta. Hortic.* 666. Doi: 10.17660/ActaHortic.2005.666.0



# Sistema Integrado de Diagnóstico y Recomendación (DRIS) para piña (*Ananas comosus*), variedad Oro Miel (MD-2)

Diagnosis and Recommendation Integrated System (DRIS) for pineapple (*Ananas comosus*), Honey Gold variety (MD-2)



JENNIFER LÓPEZ-MONTOYA<sup>1, 2</sup>  
JÉSSICA ALEJANDRA FERNÁNDEZ-PAZ<sup>1</sup>  
HERNEY DARÍO VÁSQUEZ<sup>1</sup>  
JUAN CARLOS MENJIVAR-FLORES<sup>1</sup>

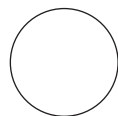
**Cultivo de piña, 13 meses de edad después de la siembra.**

Foto: J. López-Montoya

## RESUMEN

La piña (*Ananas comosus*), es la tercera especie tropical más importante, se cultiva en países tropicales y subtropicales, en ese orden de ideas y dada la importancia del cultivo, se hace necesario contar con una herramienta para un adecuado diagnóstico nutricional, es así como la presente investigación buscó determinar las normas DRIS (Sistema Integrado de Diagnóstico y Recomendación) para el cultivo de piña, esta es una metodología de interpretación de análisis foliares, basada principalmente en el establecimiento de poblaciones de referencia para la obtención de normas o relaciones ideales de nutrientes, las cuales sirven para la interpretación del contenido nutricional de una determinada especie. Se utilizó un diseño en bloques completos al azar, con seis tratamientos y cuatro repeticiones basados en diferentes planes de fertilización muestreando cuatro etapas del cultivo. Se usó un suelo con pH de 3. Los resultados mostraron deficiencias de B, S y Zn, elementos como el Cu y Na presentaron limitaciones por excesos seguido del Fe solo para la primera etapa y el P fue uno de los elementos minerales que presentó un equilibrio durante toda la etapa del cultivo. El orden decreciente de las limitantes por deficiencia para concentraciones en tejido foliar en piña se dividió en cuatro etapas de desarrollo del cultivo, la primera etapa de 3 meses después de la siembra, se encontró Mn>B>S>Ca>K>Mg>Cu>N>P>Zn>Na>Fe, la segunda etapa de 6 meses después de la siembra Zn>B>Na>Ca>Mn>Mg>K>N>P>S>Cu, la tercera etapa de 9 meses después de la siembra B>Zn>S>Mn>Ca>N>K>P>Mg>Na>Cu, y la última etapa de 12 meses después de la siembra B>Zn>Mn>Ca>Mg>N>K>S>Na>P>Cu.

**Palabras clave adicionales:** análisis foliares, frutales, rendimiento, nutrición, valores de referencia, fertilización, diagnóstico nutricional.



<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Palmira (Colombia). ORCID López-Montoya, J.: 0000-0003-2565-5436; ORCID Fernández-Paz, J.A.: 0000-0002-1307-4055; ORCID Vásquez, H.D.: 0000-0001-9579-5149; ORCID Menjivar-Flores, J.C.: 0000-0002-0985-7778

<sup>2</sup> Autor para correspondencia. [jelopezmo@unal.edu.co](mailto:jelopezmo@unal.edu.co)

## ABSTRACT

Pineapple (*Ananas comosus*) is the third most important tropical species and is grown in tropical and subtropical countries. Given the importance of this crop, it is necessary to have a tool for proper nutritional diagnosis. So, the present study sought to determine the DRIS (Integrated Diagnostic and Recommendation System) standards for the cultivation of pineapple, that is, a methodology for the interpretation of foliar analyzes, based mainly on the establishment of reference populations for obtaining norms or ideal relationships of nutrients, which serve for the interpretation of the nutritional content of a certain species. A randomized complete block design was used, with six treatments and four repetitions, based on different fertilization plans, sampling four stages of the crop. A soil with a pH of 3 was used. The results showed deficiencies of B, S and Zn; elements such as Cu and Na showed limitations as a result of excesses, followed by Fe, but only for the first stage, while P was one of the mineral elements that presented a good balance during the entire stage of the crop. The decreasing order of deficiency constraints for the leaf tissue concentrations in the pineapple was divided into four stages of crop development: the first stage 3 months after sowing: Mn>B>S>Ca>K>Mg>Cu>N>P>Zn>Na>Fe, the second stage 6 months after sowing: Zn>B>Na>Ca>Mn>Mg>K>N>P>S>Cu, the third stage 9 months after sowing: B>Zn>S>Mn>Ca>N>K>P>Mg>Na>Cu, and the last stage 12 months after sowing: B>Zn>Mn>Ca>Mg>N>K>S>Na>P>Cu.

**Additional key words:** foliar analysis, interpretation, nutrients, fruit plants, yield, nutrition, reference values, fertilization, nutritional diagnosis.

Fecha de recepción: 16-10-2017 Aprobado para publicación: 30-05-2018

## INTRODUCCIÓN

*Ananas comosus* (L.) Merr., es una planta frutícola herbácea perenne tropical perteneciente a la familia Bromeliaceae, su centro de origen está ubicado en América del Sur en la región del Matto Grosso entre Uruguay y Brasil (León, 2000) y se conoce con los nombres de piña, naná, ananás, piña tropical y piña de azúcar (García y Serrano, 2005).

A nivel mundial la piña ocupa el tercer lugar entre las frutas tropicales, después del banano y los cítricos (Sema *et al.*, 2010). Los cinco mayores productores son los países de Tailandia, Brazil, Indonesia, Filipinas y Costa Rica, mientras el 70% de su producción es consumida internamente, solamente el 30% es exportado (Hassan *et al.*, 2011).

En Colombia, para el año 2016, se produjeron 801.081 t, de un total de 18.378 ha cosechadas y los departamentos como Santander, Meta, Valle del Cauca y Cauca ocupan los primeros lugares en producción (Ministerio de Agricultura, 2016). Combatt *et al.* (2008) reportan que la piña se cultiva en diferentes suelos en Colombia y solamente en pocos casos se aplican las correcciones necesarias.

“El manejo de la fertilización es uno de los factores de mayor relevancia en el cultivo de piña” (Marca-Huamancha *et al.*, 2018). Actualmente existen métodos

eficientes para el diagnóstico nutricional de los cultivos, entre los que se encuentran de uso frecuente son el diagnóstico de los niveles críticos, rangos de suficiencia y el Sistema Integrado de Diagnóstico y Recomendación (DRIS), solo por mencionar algunos (Chacón, 2012). El DRIS, por sus siglas en inglés, “es un conjunto de normas de diagnóstico nutricional de cultivos, mediante la calibración de la composición de los tejidos, la composición del suelo, las condiciones ambientales y prácticas integrales de manejo del cultivo” (Rodríguez y Rodríguez, 2000).

El DRIS fue propuesto inicialmente por Beaufils en la década de los años 60's (Sumner, 1977), en proyectos de fisiología y nutrición vegetal para el cultivo de cauchero en Vietnam, maíz y caña de azúcar en Suráfrica (Rodríguez y Rodríguez, 2000). Muchos países cuentan con estas normas para diversos cultivos, existen reportes de investigaciones en café (Da Costa *et al.*, 1997), caña (Beaufils y Sumner, 1976; Elwali y Gascho, 1984), maíz (Baldock y Schulte, 1996), limón (Cerdeira *et al.*, 1995), piña (Angeles *et al.*, 1990), vid (Sharma *et al.*, 2005), soya (Bell *et al.*, 1995), entre otros.

Para el establecimiento de la norma es necesario contar con poblaciones de referencia basadas en valores

de alto y bajo rendimiento para el cultivo de estudio (Chacón, 2012). A partir de los datos de rendimiento y análisis foliares, se originan relaciones directas o inversas entre pares de nutrientes (Urricariet *et al.*, 2004) para obtener los índices que finalmente son interpretados en la tabla de referencia propuesta por Wadt (1996).

Es de resaltar que el cultivo de la piña ha sido bien aceptado a nivel mundial, pues atrae a productores-inversionistas. Es una planta de metabolismo CAM (*Crassula acid metabolism*) con eficiente uso de agua (Vásquez *et al.*, 2012). A pesar de ello, hay una serie de factores de gran relevancia que limitan la producción y óptima calidad, como es la nutrición vegetal (Herrera, 2015). En Colombia las investigaciones en normas DRIS son escasas para varios cultivos. La interpretación de los análisis foliares se realiza a través del nivel crítico o rangos de suficiencia en la mayoría de los casos, en ese sentido el cultivo de piña carece de investigación local con resultados acordes a las condiciones del país, ya que el diagnóstico nutricional se realiza con datos de otros países.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar el Sistema Integrado de Diagnóstico y Recomendación (DRIS), para el cultivo de piña (*Ananas comosus*), variedad oro miel (MD-2), en condiciones edafoclimáticas del municipio de Santander de Quilichao, Cauca (Colombia).

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el municipio de Santander de Quilichao, Cauca (Colombia), a 03° 30'53,2'' N y 76°18'02,2' W, una altitud de 1.030 msnm, con una temperatura media de 27°C, humedad relativa del 60% y una precipitación promedio de 1.800 mm

año<sup>-1</sup> (Ideam, 2016). Según análisis, el tipo de suelo fue franco-arcilloso, con un pH de 3,6, muy por debajo de lo recomendado por Vásquez *et al.* (2012) con un óptimo entre 5 y 6.

Se evaluó plantas de piña variedad MD-2, establecidas a una densidad de siembra de 66.000 plantas/ha. Las unidades experimentales (UE) fueron divididas en parcelas de 4,5×5 m para un área de 22,5 m<sup>2</sup>, seis parcelas por cada bloque, con una separación de parcelas de 1 m<sup>2</sup> y la separación entre bloques de 2 m<sup>2</sup>; el área total tenía 50 m<sup>2</sup> largo por 20 m<sup>2</sup> ancho.

Se utilizó un diseño en bloques completos al azar con seis tratamientos y cuatro repeticiones, para un total de 24 unidades experimentales. Los tratamientos consistieron en la aplicación de diferentes niveles de NPK teniendo en cuenta las concentraciones de los nutrientes en el suelo y los planes de fertilización que aplican los agricultores de la zona. La concentración de nutrientes en el suelo sin fertilizar se tomó como tratamiento testigo T0; T1 y T2 fueron tratamientos recomendados por agricultores de la zona, los tratamientos T3, T4, T5 fueron tratamientos propuestos por los investigadores guardando relación entre los nutrientes NPK y la concentración de estos en el suelo según el resultado del análisis de suelos, los demás elementos se aplicaron de acuerdo con las dosis establecidas por los agricultores. En la tabla 1 se muestran la descripción de los tratamientos, dosis y productos aplicados.

Se colectaron en horas de la mañana un total de 72 muestras foliares de acuerdo con la metodología planteada por Centro Internacional para Agricultura Tropical (CIAT, 1993), consistió en colectar la planta completa y se tomaron hojas de la parte baja, media y alta de la planta; en cuatro etapas de desarrollo del

**Tabla 1. Descripción de tratamientos, dosis y productos evaluados en piña 'Oro Miel' en Santander de Quilichao, Colombia.**

Tratamiento	Fertilizante aplicado por planta (g/unidad experimental)					
	Urea [CO(NH) <sub>2</sub> ]	Fosfato diamónico [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ]	Cloruro de potasio [KCl]	Sulfato de potasio [K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	Sulfato de amonio [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	Fosfato monoamónico [NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]
T0	0	0	0	0	0	0
T1	8.125	2.250	6.000	4.750	750	1.500
T2	13.000	1.750	8.125	4.500	0	0
T3	5.068	4.656	3.792	4.500	0	0
T4	6.464	4.884	4.872	4.500	0	0
T5	7.528	7.444	6.264	4.500	0	0

cultivo 3, 6, 9 meses en etapa vegetativa y a los 12 meses etapa de floración en cada una de las etapas se tomaron un número total de 18 muestras, tres repeticiones por tratamiento. Las variables de respuesta fueron el contenido de nutrientes en  $\text{g kg}^{-1}$  de peso seco y rendimiento en  $\text{kg}$ . Se utilizó un análisis de varianza para comparar las dos poblaciones (de referencia y no referencia).

Las muestras fueron llevadas al laboratorio de servicios analíticos del CIAT para su análisis químico, en el cual se determinó N y P por espectrometría, Ca, Mg, Cu, Zn, Mn y Fe total por absorción atómica (Ab. At), Na por Em. Atómica, B por espectrometría Azometina y S total por turbidimetría para las muestras foliares. El laboratorio contaba con una temperatura de  $22 \pm 3^\circ\text{C}$  y humedad relativa  $60 \pm 5\%$ .

Para determinar las poblaciones de referencia (alto y bajo rendimiento), se partió de los análisis foliares y los valores de rendimiento; estos se calcularon a partir de la multiplicación del peso fresco promedio del fruto por la densidad de plantas establecida en el lote experimental, según lo propuesto por Rebolledo *et al.* (2006), fueron organizados en una hoja de cálculo de Microsoft Excel, a estos se les realizó un análisis estadístico para la obtención de medias, desviaciones estándar y coeficientes de variación (Herrera, 2015). Con los resultados anteriores se obtuvo la media general de todos los datos de rendimiento y aquellos valores que estuvieron por encima de la media general se escogieron como población de referencia y los que estuvieran por debajo de la media general, fueron la población de no referencia.

### Obtención de los índices DRIS foliares e interpretación

Las normas del Sistema Integrado de Diagnóstico y Recomendación, se determinaron a partir de la metodología propuesta por Sumner (1977), en donde las relaciones directas e inversas entre los elementos, dos a dos para la población de alto y bajo rendimiento, expresando que “la relación es directa si el nutriente en cuestión aparece en el numerador (A/B), y la relación es inversa si aparece en el denominador” (Mourão-Filho, 2004), además de ello se calculó para cada una de las relaciones, la media ( $\bar{x}$ ), la desviación estándar ( $s$ ), la varianza ( $S$ ) y el coeficiente de variación ( $CV$ ). Y para saber el número de relaciones posibles (RP) se utilizó la fórmula (1) reportada por Herrera (2015).

$$RP = n(n-1) \quad (1)$$

donde,  $n$  es el número de nutrientes en estudio.

Para la obtención de las relaciones que se convirtieron en norma o relaciones ideales, se usó la metodología utilizada por Beaufils (1976), en donde se tiene en cuenta las varianzas de las distintas relaciones en cada una de las poblaciones (referencia y no referencia), seleccionando las relaciones que presentan menor variabilidad (Franco, 2007). Para ello se dividió las varianzas de la población de no referencia sobre la varianza de la población de referencia (Chacón, 2012).

Para cada una de las muestras tomadas, se calcularon los índices DRIS, utilizando como valores de referencia el promedio de las concentraciones en la población de bajo rendimiento, las funciones DRIS se calculan con el método de Beaufils (Chacón, 2012). “Esto con el fin de identificar los posibles desbalances nutricionales y establecer el orden de requerimiento para cada uno de los nutrientes a nivel foliar” (Sánchez *et al.*, 2009).

$$1) \int \frac{A}{B} = \frac{A/B}{a/b} - 1 \frac{1000}{CV} \quad (2)$$

$$2) \int \frac{A}{B} = 1 - \frac{a/b}{A/B} \frac{1000}{CV} \quad (3)$$

donde,  $A/B$  es relación de la muestra,  $a/b$  relación de población de referencia,  $CV$  coeficiente de variación. Se aplicó el caso 1) cuando  $A/B$  es mayor o igual a  $a/b$ , fórmula (2) y el caso 2) cuando  $A/B$  es menor o igual a  $a/b$ , fórmula (3).

Una vez realizadas las funciones de cada una de las relaciones, se calcularon los índices de los elementos involucrados y se determinó las ecuaciones generales de los índices DRIS para cada uno de los elementos según García (2000).

Cada uno de los índices es la medida de las funciones de las relaciones donde está el nutriente. “Si la relación es directa se le respeta el signo (+), pero si es inversa se le cambia de signo (-)”. Una vez obtenido el cálculo de cada uno de los índices de los nutrientes, se establece el Índice de Balance Nutricional (IBN), el cual es una suma algebraica de los valores absolutos de cada uno de los índices para cada elemento mineral (Chacón, 2012), así:



$$IBN = |I(N)| + |I(P)| + |I(K)| + |I(Ca)| + |I(Mg)| + |I(Na)| + |I(Cu)| + |I(Zn)| + |I(Mn)| + |I(Fe)| + |I(S)| + |I(B)|$$

También se calculó el IBN medio (Wadt, 1999), el cual se determina mediante el resultado de IBN sobre el número de índices (n), así.

$$IBNm = IBN/n \quad (4)$$

### Interpretación de los índices DRIS

Wadt (1996) clasificó los valores obtenidos para cada nutriente de acuerdo con el potencial de respuesta al manejo de la fertilización realizado (Tab. 2).

**Tabla 2. Criterio para la interpretación de los índices DRIS.**

Criterio	Estado nutricional
$I(N) < 0$ y $ I(N)  > IBNm$	Deficiente
$I(N) > 0$ y $ I(N)  \leq IBNm$	Equilibrado
$ I(N)  > IBNm$	Exceso

N: corresponde al nutriente de análisis. Fuente: adaptado de Wadt (1996).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estableció la población de referencia basados principalmente en el promedio general del rendimiento de los tratamientos (Tab. 3).

**Tabla 3. Promedios de rendimiento (por unidad experimental) de piña 'Oro miel' en los tratamientos evaluados para Santander de Quilichao, Colombia.**

Valores promedio de rendimiento (kg)	
T0 (Testigo)	446,75
T1	939,25
T2	742,00
T3	786,50
T4	743,00
T5	946,00
Promedio	767,25

Tratamientos descritos en tabla 1.

Esta selección cumple con los criterios establecidos por Letzsch y Sumner (1984), quienes postularon que la población de referencia al menos debe contener un

10% de las observaciones de una base de datos global, esto con el fin de garantizar diferencias significativas con la población de no referencia. Para población de referencia se tuvo un rendimiento total de 2.671,75 kg/unidad experimental, comparado con la población de baja producción que solo obtuvo un rendimiento de 1.931,75 kg/unidad experimental.

Hay que tener en cuenta que para las 132 relaciones posibles (RP) de los nutrientes evaluados en los análisis foliares, se debe determinar las cuatro etapas y las dos poblaciones. Se calculó para cada relación: media, desviación estándar, varianza y coeficiente de variación para la obtención de las normas (Urricariet *et al.*, 2004). La tabla 4 presenta los valores obtenidos de los nutrientes evaluados en cada uno de los análisis foliares.

En consecuencia de lo anterior, se puede decir que la varianza por lo general es menor en una población de referencia que en una población de baja producción (Herrera, 2015). También que el valor promedio de N en las dos primeras etapas de desarrollo del cultivo es mayor en la población de alto rendimiento, contrario a lo que sucede en las dos siguientes etapas que el contenido promedio disminuye conforme avanza la edad de la planta (Chacón, 2012).

Por otra parte, en la población de no referencia el contenido promedio de N se mantiene casi estable durante toda la etapa de crecimiento, esto puede deberse a que las plantas de la población de alta productividad aprovecharon el N en las primeras etapas de desarrollo para la formación de estructuras como tejidos o alimento para la planta (Marschner, 2011), pero que en la población de no referencia la planta se mantuvo en un tamaño y peso constante y no necesito del N esencialmente para la formación de algún tipo de estructura la cual le permitiera tener mejor rendimiento. El K que es uno de los elementos que aumentó considerablemente en todas las etapas de desarrollo en las dos poblaciones.

El P en la población de referencia presenta una mayor absorción en la segunda etapa del cultivo y en las dos últimas etapas esta absorción disminuye, este comportamiento es similar al de la población de no referencia, pero esta población presenta menores cantidades de absorción.

El K presenta un comportamiento y absorción parecido en las dos poblaciones, incrementando la demanda de K a medida que avanza el crecimiento del cultivo,

**Tabla 4. Análisis foliares de piña 'Oro miel' en diferentes etapas de crecimiento para la población de referencia y no referencia de un estudio DRIS.**

Variable	Población de referencia				Población de no referencia			
	Media	Desviación	Varianza	Coficiente	Promedio	Desviación	Varianza	Coficiente
Etapa 1 (3 meses de edad)								
N (g kg <sup>-1</sup> )	18,1	0,53	0,28	11,21	17,79	4,93	24,32	0,27
P (g kg <sup>-1</sup> )	1,26	0,17	0,03	0,13	1,14	0,29	1,21	0,25
K (g kg <sup>-1</sup> )	10,46	1,80	3,25	0,17	12,79	4,58	20,99	0,35
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	2,46	0,42	0,18	0,17	2,82	0,70	0,50	0,24
Mg(g kg <sup>-1</sup> )	1,98	0,18	0,03	0,09	2,12	0,48	0,23	0,22
Na (g kg <sup>-1</sup> )	0,073	0,0040	0,00002	0,05	0,07	0,02	0,00	0,27
Cu (g kg <sup>-1</sup> )	0,02	0,013	0,00017	0,56	0,03	0,02	0,00	0,56
Zn (g kg <sup>-1</sup> )	0,070	0,011	0,00012	0,15	0,06	0,02	0,00	0,34
Mn(g kg <sup>-1</sup> )	0,24	0,05	0,0025	0,2	0,38	0,18	0,03	0,46
Fe (g kg <sup>-1</sup> )	0,34	0,07	0,004	0,2	0,36	0,07	0,01	0,2
S (g kg <sup>-1</sup> )	1,49	0,16	0,03	0,1	1,60	0,33	0,11	0,2
B (g kg <sup>-1</sup> )	0,0093	0,0004	0	0,043	0,01	0,001	0,00	0,01
Etapa 2 (6 meses de edad)								
N(g kg <sup>-1</sup> )	23,21	1,92	3,68	0,08	19,78	3,95	15,60	0,19
P (g kg <sup>-1</sup> )	1,50	0,11	0,01	0,06	1,40	0,12	0,01	0,08
K (g kg <sup>-1</sup> )	37,67	5,85	34,23	0,15	40,41	3,05	9,30	0,075
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	1,48	0,32	0,10	0,21	2,53	1,00	0,99	0,39
Mg(g kg <sup>-1</sup> )	1,72	0,33	0,11	0,19	2,14	0,62	0,38	0,28
Na (g kg <sup>-1</sup> )	0,10	0,03	0,001	0,3	0,09	0,02	0,001	0,25
Cu (g kg <sup>-1</sup> )	0,03	0,01	0,0001	0,33	0,03	0,01	0,0001	0,36
Zn (g kg <sup>-1</sup> )	0,08	0,01	0,0001	0,12	0,04	0,01	0,0002	0,35
Mn(g kg <sup>-1</sup> )	0,31	0,03	0,001	0,1	0,41	0,11	0,01	0,26
Fe (g kg <sup>-1</sup> )	0,0003	0,0001	0		0,00	0,0001	0	
S (g kg <sup>-1</sup> )	1,74	0,08	0,01	0,045	1,67	0,21	0,04	0,12
B (g kg <sup>-1</sup> )	0,04	0,03	0,00	0,75	0,02	0,01	0,0001	0,4
Etapa 3 (9 meses de edad)								
N (g kg <sup>-1</sup> )	18,54	3,02	9,10	0,16	19,03	3,12	9,74	0,16
P (g kg <sup>-1</sup> )	0,97	0,07	0,00	0,07	0,82	0,11	0,01	0,13
K (g kg <sup>-1</sup> )	47,54	2,76	7,61	0,05	44,82	3,87	14,99	0,08
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	2,39	0,55	0,30	0,23	2,73	0,79	0,62	0,28
Mg(g kg <sup>-1</sup> )	2,09	0,39	0,15	0,18	2,33	0,47	0,23	0,2
Na (g kg <sup>-1</sup> )	0,06	0,01	0,0001	0,16	0,06	0,01	0,0001	0,16
Cu (g kg <sup>-1</sup> )	0,02	0,01	0,0001	0,5	0,02	0,01	0,0001	
Zn (g kg <sup>-1</sup> )	0,04	0,004	0		0,03	0,01	0,0001	0,33
Mn(g kg <sup>-1</sup> )	0,24	0,04	0,0017	0,16	0,29	0,06	0,0038	0,2
Fe (g kg <sup>-1</sup> )	0,0002	0,00003	0		0,0001	0,00002	0,0000	
S (g kg <sup>-1</sup> )	2,19	0,17	0,03	0,07	2,23	0,22	0,05	0,09
B (g kg <sup>-1</sup> )	0,03	0,01	0,0001	0,33	0,02	0,004	0,00002	0,2

Continuación Tabla 4.

Variable	Población de referencia				Población de no referencia			
	Media	Desviación	Varianza	Coficiente	Promedio	Desviación	Varianza	Coficiente
Etapa 4 (12 meses de edad)								
N (g kg <sup>-1</sup> )	13,30	1,52	2,30	0,11	19,51	1,36	1,84	0,069
P (g kg <sup>-1</sup> )	1,04	0,06	0,00	0,04	0,94	0,05	0,00	0,05
K (g kg <sup>-1</sup> )	56,48	4,28	18,35	0,07	40,78	13,02	169,56	0,31
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	2,25	0,27	0,07	0,11	2,91	1,56	2,43	0,53
Mg(g kg <sup>-1</sup> )	1,85	0,19	0,03	0,09	2,33	1,16	1,35	0,49
Na (g kg <sup>-1</sup> )	0,11	0,02	0,001	0,18	0,09	0,01	0,00	0,11
Cu (g kg <sup>-1</sup> )	0,02	0,01	0,0001	0,43	0,02	0,00	0,00	0,2
Zn (g kg <sup>-1</sup> )	0,05	0,02	0,0003	0,2	0,04	0,01	0,00	0,17
Mn(g kg <sup>-1</sup> )	0,32	0,05	0,003	0,156	0,51	0,11	0,01	0,21
Fe (g kg <sup>-1</sup> )	0,0001	0,00002	0,000		0,0001	0,00	0,00	
S (g kg <sup>-1</sup> )	1,91	0,12	0,01	0,05	1,88	0,15	0,02	0,07
B (g kg <sup>-1</sup> )	0,03	0,003	0,00001	0,09	0,03	0,00	0,00	0,03

incluso la población de no referencia presenta mayores valores de absorción en la primera etapa comparada con la población de referencia.

El comportamiento de los demás elementos se puede clasificar en tres grupos, Ca-Mg-Mn-Fe presentaron mayor absorción en las poblaciones de no referencia y tuvieron picos de mayor absorción en diferentes etapas de desarrollo del cultivo en ambas poblaciones.

Por otro lado, Zn, B y Na presentan mayor absorción en las poblaciones de referencia con respecto a las poblaciones de no referencia, el Zn tuvo un comportamiento de absorción decreciente, las primeras etapas tuvieron mayor demanda y al final del ciclo la demanda disminuyó, el B presentó mayores valores de absorción en el segundo ciclo del cultivo mientras el Na va aumenta su requerimiento.

El Cu y el S presentaron comportamientos de absorción y concentraciones similares en las poblaciones de referencia y de no referencia.

### Obtención de la norma o relaciones ideales

Las relaciones que se convirtieron en normas fueron seleccionadas con base a las diferencias significativas entre las varianzas (Franco, 2007) para cada una de las etapas de desarrollo del cultivo. Del análisis total de

las muestras foliares por etapas se eligió un número total de 66 relaciones de las 132, esto concuerda con el estudio realizado en caucho por Chacón *et al.* (2012) en donde seleccionó de las 132 RP un total de 66 y que además considero como importantes las relaciones N/P, N/K y N/Ca.

De las 66 relaciones ideales escogidas para cada una de las etapas de crecimiento del cultivo, se observa que 22 tiene una varianza alta, las relaciones Mg/S y Na/Cu presentaron varianzas demasiado negativas, mientras 42 mostraron menor variabilidad, entre los que se destaca las relaciones de K con la mayoría de los elementos.

### Obtención de los índices DRIS

De los análisis foliares de cada una las etapas se realizaron el diagnóstico nutricional junto con las normas DRIS obtenidas para cada una de las etapas. Hay que tener en cuenta que esta metodología dice que la interpretación se valida con la estimación de los índices para cada par de nutrientes, tanto de la muestra foliares tomada en campo como de las relaciones ideales DRIS correspondientemente (Chacón *et al.*, 2012). En la tabla 5 se muestran los índices DRIS para cada elemento en todas etapas de desarrollo del cultivo.

Se manifiesta que los coeficientes de variación no están en porcentajes, por lo tanto, hay valores muy

**Tabla 5. Índices DRIS de interpretación de los diferentes nutrientes para las cuatro etapas de desarrollo en el cultivo de piña 'Oro Miel'.**

Índices DRIS				
Nutriente	Etapas 1	Etapas 2	Etapas 3	Etapas 4
N	176,83	4,30	-2,86	-12,87
P	278,09	191,55	97,87	285,16
K	-20,11	-3,97	0,41	9,93
Ca	-70,92	-635,57	-160,49	-101,86
Mg	20,53	-46,51	1640,89	-48,4
Na	6183,73	-1430,65	4344,49	126,82
Cu	45,44	76909,78	7861,65	14417,24
Zn	894,71	-39449,85	-2665,65	-6676,75
Mn	-76239,88	-653,5	-590	-558,86
Fe	75743,95			
S	-99,02	323,30	-1504,29	73,10
B	-1084,72	-35116,55	-9022,9	-7582,99
IBN <sup>1</sup>	160857,95	154765,53	27891,5	29893,98
IBNm <sup>2</sup>	13404,82	12897,12	2324,29	2491,16

<sup>1</sup>IBN: índice de balance nutricional.

<sup>2</sup>IBNm: índice de balance nutricional medio.

pequeños comparados con valores grandes, es por ese motivo que algunos valores de índices DRIS son tan altos. Además de ello que los valores del análisis foliar todos se encontraban unidades de g kg<sup>-1</sup>, por lo tanto, había valores muy pequeños en gramos, principalmente en los micronutrientes, y los elementos mayores no se encontraban en porcentaje. Esto último se hizo con el fin de estandarizar los valores de los análisis foliares.

### Interpretación de los índices DRIS

De acuerdo con la metodología reportado por Beaufile (1973) y clasificada por Wadt (1996), los resultados de los índices DRIS para los primeros 3 meses de desarrollo del cultivo de piña muestran que el elemento que presentó deficiencia fue el Mn y que los nutrientes N, P, Mg, Na, Cu y Zn estaban en equilibrio. Por otra parte, el elemento Fe, fue el que mostró excesos, pues el índice era superior IBNm.

Los nutrientes que presentaron mayor deficiencia, para la primera etapa desarrollo, se encuentran en el siguiente orden: Mn > B > S > Ca > K > Mg > Cu > N > P > Zn > Na > Fe.

El Fe fue uno de los elementos que presentó mayor variabilidad en las dos poblaciones, pues se vio que en la primera etapa de desarrollo se encontraba en cantidad probablemente altas, pero que cuando fue avanzada la edad del cultivo este disminuyó considerablemente.

Ya para la segunda etapa de desarrollo del cultivo, el B y el Zn fueron los elementos más limitantes para el desarrollo vegetal por déficit. La deficiencia de B puede ser el causando de grietas en el fruto (Malézieux y Bartholomew, 2003), pero que no fueron observados en el cultivo. Los nutrientes N, P y S se encontraban equilibrados. Y el Cu fue para esta etapa de desarrollo el más excesivo.

Los nutrientes que presentaron mayor deficiencia para la segunda etapa de desarrollo del cultivo se encontraban en el siguiente orden de acuerdo con los índices DRIS: Zn > B > Na > Ca > Mn > Mg > K > N > P > S > Cu.

En la tercera etapa de desarrollo del cultivo se pudo observar que los elementos B y S se encontraban en un estado limitante del desarrollo vegetal por deficiencia por lo contrario el Cu seguía presentando excesos en la planta, como también el Na. El P fue uno de los elementos que permaneció equilibrado, siguiendo con la tendencia de la primera etapa.

El orden de los nutrientes que presentaron mayor deficiencia para la tercera etapa de desarrollo del cultivo de piña fueron los siguientes: B > Zn > S > Mn > Ca > N > K > P > Mg > Na > Cu.

Por último, B y Zn siguieron presentando deficiencias, el Cu fue el nutriente más limitante por excesos en esta etapa, mientras el P permaneció en estado equilibrado durante toda la etapa del cultivo, teniendo en cuenta que el P contribuye al crecimiento en todas las partes de esta especie frutal (Vásquez *et al.*, 2012). Los demás elementos no presentaron un valor acorde a los establecidos en el parámetro de interpretación DRIS.

El orden de los nutrientes que presentaron mayor deficiencia para la última etapa de muestreo fue el siguiente: B > Zn > Mn > Ca > Mg > N > K > S > Na > P > Cu.

El comportamiento de los nutrientes en cada una de las etapas concuerda con lo reportado en el cultivo de palma (Herrera, 2015), donde los elementos menores se encuentran en menor limitación y los elementos mayores en mayor limitación, mientras en un estudio

realizado en nogal, Medina (2004) reporta que el Mn es el elemento que se encuentra en mayor limitación.

## CONCLUSIONES

El P, N y K no presentaron limitaciones por excesos ni por defecto lo que puede traducirse en que la planta asimiló las aplicaciones de fertilizaciones de manera eficiente.

Las dosis de los tratamientos propuestos lograron suplir los requerimientos del cultivo, sin embargo, es necesario tener en cuenta las cantidades aplicadas para que mantengan la relación entre los nutrientes y no haya desbalances nutricionales sobre todo con los elementos menores.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se llevó a cabo gracias a la financiación de la Alcaldía del Municipio de Santander de Quilichao y la Universidad Nacional de Colombia en el marco del proyecto “Determinación de los requerimientos nutricionales de la piña variedad MD-2 en suelos ácidos del Municipio de Santander de Quilichao”. Los autores agradecen especialmente a la Asociación Frupasa de la vereda Alegrías, al profesor Héctor Fabio Ramos y al grupo de tesis.

**Conflicto de intereses:** el manuscrito fue preparado y revisado con la participación de los autores, quienes declaran no tener algún conflicto de interés que coloquen en riesgo la validez de los resultados aquí presentados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angeles, D., M. Sumner y N. Barbour. 1990. Preliminary nitrogen, phosphorus and potassium DRIS norms for pineapple. *HortScience* 25, 652-655.
- Baldock, J.O. y E.E. Schulte. 1996. Plant analysis with standardized scores combines DRIS and sufficiency range approaches for corn. *Agron. J.* 88, 448-456. Doi: 10.2134/agronj1996.00021962008800030015x
- Beaufils, E. 1973. Diagnosis and Recommendation Integrated System (DRIS): a general scheme for experimentation and calibration based on principles developed from research in plant nutrition. *Soil Science Bulletin* No. 1. Department of Soil Science and Agrometeorology University of Natal, Pietermaritzburg, Sudáfrica.
- Beaufils, E. y M. Sumner. 1976. Application of the DRIS approach for calibrating soil, plant yield and quality factors of sugarcane. *Sugar Tech. Assoc.* 50, 118-124.
- Bell, P., W. Hallmark, W. Sabbe y D. Dombek. 1995. Diagnosing nutrient deficiencies in soybean, using M-DRIS and critical nutrient level procedures. *Agron. J.* 87, 859-865. Doi: 10.2134/agronj1995.00021962008700050013x
- Cerda, A., M. Nieves y V. Martínez. 1995. An evaluation of mineral analysis of Verna lemons by DRIS. *Com. Soil Sci. Plant Anal.* 26, 1697-1707. Doi: 10.1080/00103629509369402
- Chacón, E. 2012. Obtención de la norma de diagnóstico y recomendación integral (DRIS) para el cultivo de caucho (*Hevea brasiliensis*) en la Altillanura Colombiana. Tesis de doctorado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1993. Manual de análisis de suelos y tejido vegetal. Guía Teórica y práctica de metodologías. Cali, Colombia.
- Combatt, E., A. Jarma y A. Cleves 2008. Efecto del enclavamiento de suelos sulfatados ácidos en Córdoba (Colombia) sobre el fruto de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.). *Rev. Colomb. Cienc. Hortic.* 2(2), 173-179. Doi: 10.17584/rch.2008v2i2.1185
- Da Costa, A. y L. Prezotti. 1997. Padrao de referencia para uso do DRIS na avaliação nutricional do café arábica. *Inf. Agr.* 80, 9-10.
- Elwali, A. y G. Gascho. 1984. Soil testing, foliar analysis, and DRIS as guides for sugarcane fertilization. *Agron. J.* 76, 466-470. Doi: 10.2134/agronj1984.00021962007600030024x
- Franco, H. 2007. Determinación de normas de diagnóstico nutricional para el cultivo de rosa de corte en Colombia. Tesis de maestría. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- García, M. y H. Serrano. 2005. La piña, *Ananas comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae), algo más que un fruto dulce y jugoso. *ContactoS*, 56, 55-61.
- García, S. 2000. Establecimiento de normas DRIS, diagnóstico nutricional y calibración de las normas obtenidas para el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Coahuila y Nuevo León. Tesis de doctorado. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma Nuevo León, Marín, México.
- Hassan, A., Z. Othman y J. Siriphanich. 2011. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). pp. 194-218. En: Yahia, E.M. (ed.). *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits*. Vol. 4: Mangosteen to white sapote. Woodhead Publishing, Oxford, UK. Doi: 10.1533/9780857092618.194
- Herrera, G. 2015. Obtención del sistema integrado de diagnóstico y recomendación integral (DRIS) en el cultivo



- de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). Tesis de maestría. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Ideam (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales). 2016. Informe Sistema de Información para Santander de Quilichao, Cauca. En: [www.ideam.gov.co/](http://www.ideam.gov.co/); consulta: octubre de 2017.
- León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. 3a ed. Agroamérica Instituto Interamericano para la Agricultura, San José, Costa Rica. pp. 456-460.
- Letzsch, W. y M. Sumner. 1984. Effect of population size and yield level in selection of diagnosis and recommendation integrated system (DRIS) norms. *Com. Soil Sci.* 15, 997-1006. Doi: 10.1080/00103628409367537
- Malézieux, E. y D. Bartholomew. 2003. Plant nutrition. pp. 143-165. En: Bartholomew, D.P., R.E. Paull y K.G. Rohrbach (eds.). *The pineapple, botany, production and uses*. Cabi Publishing, Wallingford, UK. Doi: 10.1079/9780851995038.0143
- Marca-Huamancha, C., R. Borjas-Ventura, D. Rebaza-Fernández, S. Bello-Amez y A. Julca-Otiniano. 2018. Efecto de la fertilización mineral y de un fertilizante biológico en piña [*Ananas comosus* (L.) Merr.] en el cultivar MD2. *Rev. Colomb. Cienc. Hortic.* 12(1), 59-68. Doi: 10.17584/rcch.2018v12i1.7901
- Marschner, P. (ed.). 2011. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3<sup>rd</sup> ed. Academic Press; Elsevier, Amsterdam, Holanda. Doi: 10.1016/C2009-0-63043-9
- Medina-Morales, M.C. 2004. Normas DRIS preliminares para nogal pecanero. *Terra Lationoam.* 22(4), 445-450.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2016. Cadena de piña. Indicadores e instrumentos. Bogotá, Colombia.
- Mourão-Filho, F. 2004. Concepts and applications on nutritional diagnosis in fruit crops. *Sci. Agri.* 61, 550-560. Doi: 10.1590/S0103-90162004000500015
- Rebolledo M., A., A.L. del Ángel P., L. Rebolledo M., A.E. Baccerril R. y D. Uriza-Ávila. 2006. Rendimiento y calidad de fruto de cultivares de piña en densidades de plantación. *Rev. Fitotec. Mex.* 19(1), 55-62.
- Rodríguez, O. y V. Rodríguez. 2000. Desarrollo, determinación e interpretación de normas DRIS para el diagnóstico nutricional en plantas. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 17, 449-470.
- Sánchez G., A.A., J. Giralí C., L. Zérega, O.A. Rodríguez R., S.A. Oliveira y V.J. Rodríguez P. 2009. Normas preliminares DRIS desarrolladas para caña de azúcar a partir de un bajo número de muestras. *Pesq. Agropec. Bras.* 44(12), 1700-1706. Doi: 10.1590/S0100-204X2009001200020
- Sema, A., C. Maiti, A. Singh y A. Bendangsengla. 2010. Dris nutrient norms for pineapple on alfisols of India. *J. Plant Nutr.* 33, 1384-1399. Doi: 10.1080/01904167.2010.484286
- Sharma, J., S. Shikhamany, R. Singh y H. Raghupathi. 2005. Diagnosis of nutrient imbalance in Thompson Seedless grape grafted on Dog Ridge rootstock by DRIS. *Com. Soil Sci. Plant* 36, 2823-2838. Doi: 10.1080/00103620500305991
- Sumner, M. 1977. Use of the DRIS System in foliar diagnosis of crops at high yield levels. *Com. Soil Sci. Plant.* 8(3), 251-288. Doi: 10.1080/00103627709366718
- Urricariet, S., R. Lavado y L. Martín. 2004. Corn response to fertilization and SR, DRIS, and PASS interpretation of leaf and grain analysis. *Com. Soil Sci. Plant* 35, 413-425. Doi: 10.1081/CSS-120029722
- Wadt, P. 1996. Os métodos da chance matemática e do Sistema, Integrado de Diagnose e Recomendação (DRIS) na avaliação nutricional de plantios de eucalipto. Tesis de doctorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.
- Vásquez, H.D., R. Saavedra O. y S.H. Saavedra S. 2012. Piña (*Ananas comosus* L. Merr). pp. 776-801. En: Fischer, G. (ed.). *Manual para el cultivo de frutales en el trópico*. Produmedios, Bogotá, Colombia.

# Estimación de la concentración de clorofila mediante métodos no destructivos en vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Riesling Becker

## Chlorophyll concentration estimation using non-destructive methods in grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. Riesling Becker



CRISTIAN SANTIAGO CASTAÑEDA<sup>1,4</sup>  
PEDRO JOSÉ ALMANZA-MERCHÁN<sup>2</sup>  
ELBERTH HERNANDO PINZÓN<sup>3</sup>  
GERMÁN EDUARDO CELY-REYES<sup>2</sup>  
PABLO ANTONIO SERRANO-CELY<sup>2</sup>

**Cultivo de *Vitis vinifera*, cv. Riesling Becker.**

Foto: C.S. Castañeda

### RESUMEN

El análisis de pigmentos en plantas es un procedimiento de laboratorio y comúnmente no es una medida inmediata que se realice *in situ*. El SPAD 502 y CCM-200 son equipos para estimar de modo indirecto, no destructivo y rápido el contenido de clorofila. La concentración de pigmentos fotosintéticos se relaciona con la concentración foliar de nitrógeno, por lo que de forma indirecta se puede conocer la deficiencia o exceso del elemento, puede servir como fundamento técnico para sugerir el manejo adecuado del cultivo, en busca de potencializar la eficiencia fotosintética, calidad y el rendimiento de un viñedo. La investigación buscó comparar las mediciones entre el medidor portátil de clorofila SPAD-502 y CCM-200, en la variedad de uva Riesling Becker, bajo condiciones de clima frío tropical, y con ello determinar el comportamiento de clorofila durante el crecimiento de las hojas 4, 5 y 6, desde floración hasta vendimia. La relación entre las mediciones con el SPAD-502 y el CCM-200 se ajustaron a un polinomio de segundo grado determinado por la ecuación, para el Índice de Concentración de Clorofila, como  $ICC = 0,014SPAD^2 - 0,2396SPAD + 5,8021$ . Con un valor de  $R^2 = 0,9343$  ( $n = 96$ ;  $P \leq 0,0001$ ), el cual indica que existe una alta correlación entre los equipos portátiles empleados en el presente estudio para determinar la clorofila de forma no destructiva. Las evaluaciones realizadas con los equipos permitieron obtener medidas rápidas y confiables. Siendo importante la elección del momento de

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Programa de Maestría en Fisiología Vegetal, Grupo de Investigación GIPSO, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Tunja (Colombia). ORCID Castañeda, C.S.: 0000-0002-1772-5628

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Grupo de Investigaciones GIPSO, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Tunja (Colombia). ORCID Almanza-Merchán, P.J.: 0000-0002-9207-0617; ORCID Cely-Reyes, G.E.: 0000-0001-6312-3575; ORCID Serrano-Cely, P.A.: 0000-0002-1270-3024

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Grupo de Investigaciones Agrícolas, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Tunja (Colombia). ORCID Pinzón, E.H.: 0000-0001-9229-3450

<sup>4</sup> Autor para correspondencia. cscaser30@hotmail.com

medición de acuerdo con el estadio fenológico de la planta debido a la alta variabilidad en los contenidos de clorofila que se presentan en relación a la filotaxia.

**Palabras clave adicionales:** pigmentos, medidor portátil, CCM-200, SPAD 502, métodos no destructivos, viñedos tropicales, indicadores diagnósticos.

## ABSTRACT

Pigment analysis is a laboratory procedure and is not an immediate measurement to be performed in situ. The SPAD 502 and CCM-200 are equipments used for non-destructive, fast, and indirect estimates of chlorophyll contents. The concentration of photosynthetic pigments is related to the foliar concentration of nitrogen, so indirectly, it is possible to observe the deficiency or excess of this element, providing a technical basis to suggest the proper management of the crop in order to potentiate the photosynthetic efficiency, quality and yield of a vineyard. This research sought to compare measurements between the portable chlorophyll meter SPAD-502 vs. CCM-200 in the Riesling Becker grape variety under cold tropical climate conditions to determine the behavior of chlorophyll during the growth of leaves 4, 5 and 6, from flowering to harvest. The relationship between the measurements with the SPAD-502 and the CCM-200 were fit to a second degree polynomial determined with the equation for the Chlorophyll Concentration Index:  $CCI = 0.014SPAD^2 - 0.2396SPAD + 5.8021$ . With a value of  $R^2=0.9343$  ( $n=96$ ;  $P \leq 0.0001$ ), which indicates that there was a high correlation between the portable equipment used in the present study to determine chlorophyll with a non-destructive method. The evaluations carried out with the equipment obtained fast and reliable measurements, with the choice of the moment of measurement according to the phenological stage of the plant being important because of the high variability in chlorophyll contents that are presented in relation to the phylotaxy.

**Additional key words:** pigments, portable meter, CCM-200, SPAD 502, non-destructive methods, tropical vineyards, diagnostic indicators.

Fecha de recepción: 28-11-2017 Aprobado para publicación: 30-05-2018

## INTRODUCCIÓN

En Colombia se cuenta con pocas regiones que presenten ambientes favorables para el establecimiento del cultivo de vid destinada para la elaboración de vinos (Pinzón-Sandoval *et al.*, 2017; Walteros *et al.*, 2012). A pesar de ello, posee lugares adecuados por ser un país tropical con condiciones de radiación solar y temperaturas variables, que sumado a un adecuado manejo del cultivo pueden alcanzar hasta dos cosechas por año (Almanza-Merchán *et al.*, 2012a). De acuerdo con Agronet (2018), en Colombia se registró una producción nacional de 30.000 t de uva para el año 2016, donde los departamentos de Valle del Cauca y Huila participaron con las mayores producciones, 24.379 y 5.286 t, respectivamente. La mayor producción de uva con fines vinícolas en el año 2016 se registró en Boyacá, con 106,5 t, siendo éste el departamento productor de uva para vino más importante en el país.

Quijano (2004) indicó que en estas condiciones climáticas, y en especial la luminosidad, se convierte en el factor fundamental para la obtención de uva para elaboración de vinos de alta calidad.

Almanza-Merchán *et al.* (2012b) señalan que gracias a las condiciones ambientales que presentan algunos municipios de las provincias del alto Ricaurte, Sugamuxi, Tundama, Valderrama y Norte en Boyacá, se pueden cultivar diversas variedades de uva con fines vitícolas. Quijano (2004) señala que desde hace 35 años se seleccionaron las variedades actuales que se adaptaron a las condiciones climáticas de la loma de Puntalarga, en donde se presentan condiciones equivalentes a la región de Alsacia en Francia, lugar de origen de algunas variedades como Riesling, Pinot Noir y Riesling Becker. Además, Almanza (2011)

menciona como las regiones boyacenses en las cuales se encuentran situados los viñedos se caracterizan por poseer suelos de textura liviana, franco-arenosos y con fertilidad natural baja y que de acuerdo con el sistema de clasificación de zonas de vida propuestas por Holdrige, se presenta una sola zona de vida: bosque seco montano bajo (Bs-MB). Teniendo en cuenta las condiciones que poseen estas zonas productoras de uva se hace necesaria la implementación de nuevas tecnologías las cuales permitan un mejor control en el comportamiento fisiológico de las plantas, optimizando así el manejo del cultivo.

El contenido de clorofila en hojas se presenta como una de las variables importantes en el momento de evaluar el estatus fisiológico de las plantas y su relación entre las fuentes y vertederos (Do Amarante *et al.*, 2009). Esto, facilitaría determinar en qué momento una planta se encuentra en circunstancias de estrés por salinidad o por cualquier otro tipo (Alizadeh *et al.*, 2010; Delegido *et al.*, 2010; Elarab *et al.*, 2015), los cuales perjudican el proceso fotosintético y generan una reducción en la asimilación de nitrógeno y en la fijación del carbono, factores que modifican en la planta su concentración interna de clorofila alterando su coloración normal de la cual es responsable la molécula de clorofila (Steele *et al.*, 2007).

Varios estudios indican la existencia de la relación directa entre el contenido de clorofila y el contenido de nitrógeno en hojas, debido a que este elemento es necesario dentro del proceso de síntesis de la molécula de clorofila, y así mismo se encuentra ligado en la fase luminosa del proceso fotosintético (Salisbury y Ross, 1992). Trabajos realizados por Sainz y Echeverría (1998), indican la importancia del uso de métodos indirectos como el clorofilómetro de tipo SPAD® (Konica Minolta, Osaka, Japón) como herramienta para el monitoreo de la disponibilidad de nitrógeno, asociada con el rendimiento del cultivo de maíz. De igual forma, Rincón y Ligarreto (2010) encontraron relación directa entre el contenido de nitrógeno y los valores obtenidos con el clorofilómetro en plantas de maíz bajo diferentes dosis de nitrógeno. Ramírez *et al.* (2012) proponen el uso de medidores portátiles de clorofila como herramienta para la detección temprana de deficiencias de nitrógeno y disminuciones del rendimiento asociados a condiciones de estrés en plantas de café.

El uso de diferentes medidores portátiles de clorofila se fundamenta en que parte de la luz que llega a la hoja es absorbida por la clorofila y el resto que se refleja entra en contacto con la celda detectora de los

equipos siendo está convertida en una señal eléctrica. De acuerdo con sus fundamentos de uso, los equipos presentan similitudes, pero difieren en cuanto al rango de longitud de onda utilizados. Es así como el CCM-200® (Opti Sciences, Hudson, NH, USA) presenta longitudes de onda que van desde 665 (rojo) hasta 940 nm (infrarrojo) (Cate y Perkins, 2003; Cao *et al.*, 2015). En tanto, el SPAD 502 (Konica Minolta, Osaka, Japón), utiliza longitudes de onda central de 650 nm (rojo) y 940 nm (infrarrojo) (Kapotis *et al.*, 2003; Hawkins *et al.*, 2009; Romano *et al.*, 2011).

Po lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar dos métodos no destructivos para estimar las concentraciones de clorofila en hojas de *Vitis vinifera* L. cv. Riesling Becker durante el crecimiento y desarrollo, en condiciones de clima frío tropical en el municipio de Corrales, Boyacá.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en el municipio de Corrales, departamento de Boyacá, situado a 5°46'47,1" N y 72°58'36,5" W, a una altitud de 2.450 msnm. El clima de la zona se caracteriza por presentar una temperatura promedio anual de 16,5°C y precipitación bimodal media de 700 mm año<sup>-1</sup>. Se emplearon 10 plantas que presentaban una edad de 15 años y que correspondían a la selección clonal de *Vitis vinifera* L. cultivar Riesling × Silvaner, también conocida como Riesling Becker procedente de Alsacia, Alemania. Estas fueron sembradas a una distancia de 1,20 × 0,90 m, el sistema de manejo es el de tipo guyot simple con conducción en espaldera a tres alambres.

Las plantas monitoreadas pertenecían a zonas del lote donde históricamente el cultivo demuestra buen crecimiento, desarrollo y frutos aptos para la elaboración de vinos. El plan de fertilización y el manejo fitosanitario se realizó según requerimiento del cultivo.

Cuando las plantas se encontraron en estadio principal 5 (inflorescencia claramente visible), de acuerdo con la escala de la BBCH propuesta para vid por Lorenz *et al.* (1994), fueron seleccionados tres pámpanos por planta a partir de los cuales según la filotaxia fueron marcadas las hojas 1 a 12 en cada uno. Con el fin de establecer el comportamiento de la concentración de clorofila en relación con la posición, se tomaron seis mediciones por hoja para posteriormente obtener un dato promedio, para evitar variación de los valores las mediciones fueron obtenidas de la parte basal media y apical de las hojas. La concentración de clorofila

se determinó a través de los equipos portátiles para medición no destructiva CCM-200 (Opti Sciences, Tynsgboro, MA) y el SPAD 502 (Konica Minolta, Osaka, Japón). Las mediciones fueron realizadas cada 15 d con el fin de cubrir los estadios de crecimiento y desarrollo del fruto de vid hasta llegar al estadio principal 8 (maduración del fruto).

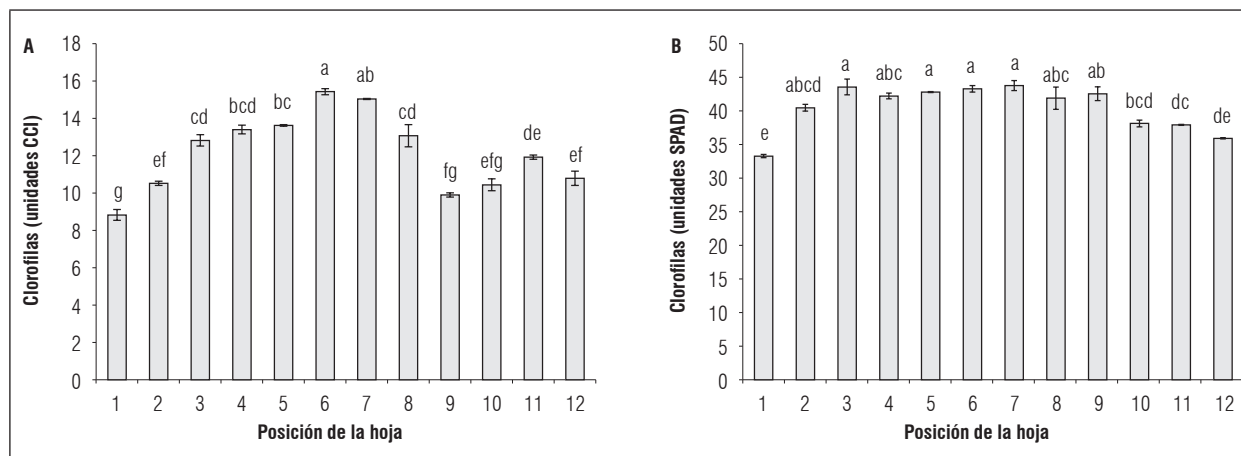
Los datos obtenidos fueron sometidos a pruebas de normalidad y homogeneidad mediante las pruebas Shapiro Wilk y Levene respectivamente, comprobando supuestos se procedió a realizar el análisis de varianza, sometiendo a pruebas de comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Para el análisis de los datos se empleó el programa estadístico SAS® v. 9.2 (Cary, NC, USA). Para la determinación de la correlación entre métodos se emplearon modelos de tipo polinomial.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En relación con el contenido de clorofila evaluado a través de los dos métodos de medición de la hoja 1 a 12 hojas fueron encontradas diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para los dos métodos en relación a la posición de la hoja en función del racimo. El menor valor se encontró en la hoja 1 para los dos métodos evaluados con valores de  $8,8 \pm 0,28$  unidades de Índice de Concentración de Clorofila (ICC) y  $33,8 \pm 0,24$  unidades SPAD, mientras que las hojas 6 y 7 mostraron los valores más altos con  $15,4 \pm 0,1$  y  $15,1 \pm 0,2$  unidades ICC respectivamente, y  $43,9 \pm 0,4$  y  $44,4 \pm 0,7$  unidades SPAD respectivamente (Fig. 1).

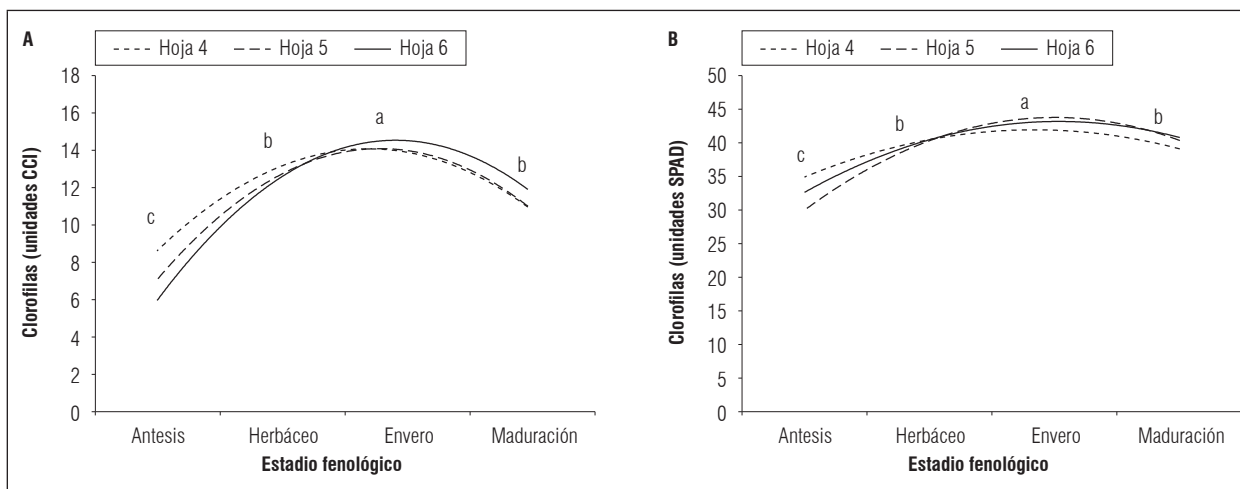
Los resultados indican que los valores más altos para los dos métodos se presentan en el tercio medio de la planta (hojas 4 a 7). De acuerdo a la posición de la hoja, los resultados obtenidos son similares a los reportados por Novoa y Villagran (2002), quienes encontraron la mayor distribución de clorofila en el tercio medio en plantas de maíz. Así mismo, Ocon (2008) reporta que debido a la gran movilidad que posee el nitrógeno, las plantas logran acumular el mayor contenido de clorofila y N en las hojas ubicadas en su tercio medio. Numerosos estudios soportan como el comportamiento de la clorofila y el nitrógeno representan un valor proporcional al de las unidades SPAD y ICC en especies como *Solanum lycopersicum* cv. Río Grande (Rodríguez *et al.*, 1998), *Solanum tuberosum* (Arregui *et al.*, 2000; Borhan *et al.*, 2017), *Zea mays* (Reyes *et al.*, 2017) y *Gossypium hirsutum* (Rosolem y Mellis, 2010), especies para biodiesel como *Jatropha curcas* (Senger *et al.*, 2014).

De igual manera, Zulini *et al.* (2007) reportan como en *V. vinifera* cv. 'White Riesling' se observa el mismo fenómeno donde a medida en que las hojas se acercan al ápice se marca la disminución de clorofila (medida como unidades SPAD) y aumentando en la parte media de los pámpanos. La cuantificación de la clorofila mediante los métodos CCM-200 y SPAD en relación al estadio fenológico presentó diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), siendo el estadio de envero en el que se presentó los mayores valores con  $14,1 \pm 0,3$  unidades ICC y  $43,4 \pm 0,2$  unidades SPAD, mientras que el estadio antesis se presentó valores de  $7,2 \pm 0,3$  unidades ICC y  $33,2 \pm 0,9$  unidades SPAD siendo los menores valores (Fig. 2).



**Figura 1. Contenido de clorofilas totales medido con: A. CCM-200 y B. SPAD 502 en hojas de *Vitis vinifera* L. cv. 'Riesling Becker' bajo condiciones de trópico alto. Promedios con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Barras verticales indican error estándar ( $n=3$ ).**





**Figura 2. Contenido de clorofila: A. CCM-200 y B. SPAD 502, en diferentes estadios fenológicos *Vitis vinifera* L. cv. 'Riesling Becker' bajo condiciones de trópico alto. Promedios con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).**

**Tabla 1. Ecuaciones de regresión para dos métodos de cuantificación no destructiva de clorofila en hojas de *Vitis vinifera* L. cv. 'Riesling Becker' bajo condiciones de trópico alto.**

Hoja	Ecuación método CCI	Ecuación método SPAD	$R^2$
4	$y = -1,8683x^2 + 10,124x + 0,3483$	$y = -2,0917x^2 + 11,856x + 25,195$	0,9
5	$y = -2,1542x^2 + 12,08x - 2,8625$	$y = -3,4458x^2 + 20,688x + 12,786$	0,9
6	$y = -2,2983x^2 + 13,472x - 5,2217$	$y = -2,5608x^2 + 15,521x + 19,726$	0,9

El contenido de clorofila se ajustó a polinomios de segundo grado para los dos métodos analizados con coeficientes de determinación  $R^2$  superiores a 0,9 indicando que estos modelos son adecuados para explicar el comportamiento de las clorofilas al cuantificarlas mediante los dos métodos (Tab. 1).

En la investigación se encontró que a medida en que las hojas adquirían tonalidades de verde intenso, el valor de unidades SPAD y ICC aumentó (Fig. 2), es por ello que se hace importante tener en cuenta la planta y la hoja a evaluar a través de estos tipos de medidores con el fin de obtener una mayor confiabilidad en el resultado, la lectura de los medidores portátiles varía marcadamente entre hojas apicales de vid y hojas completamente expandidas (Fanizza *et al.*, 1991).

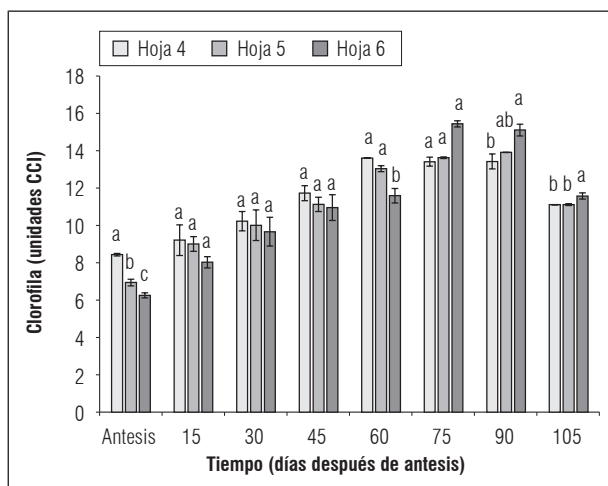
Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Allen *et al.* (2012), quienes indican que el contenido de clorofila, el área foliar y la absorción de la radiación aumentan en medida en que la hoja se hace fotosintéticamente madura. A su vez, Candolfi-Vasconcelos y Koblet (1991) indican que existe una tendencia en

el comportamiento de la clorofila en plantas de vid, en el que se da un aumento gradual, alcanzando un máximo nivel en el estadio fenológico envero, y posteriormente en el estadio de maduración disminuye, posiblemente como respuesta de la planta a una adaptación por excesos de luz generado por una senescencia temprana de la hoja.

Por su parte, autores como Almanza-Merchán *et al.* (2012a) reportan como a medida que las hojas adquieren mayor desarrollo se convierten en las principales órganos de síntesis de fotosintatos, supliendo las demandas de los frutos, los cuales se convierten en demandantes de fotosintatos, durante los periodos herbáceo y envero; lo anterior concuerda con el contenido de clorofila de las hojas observado en el presente estudio.

Teniendo en cuenta los estudios realizados por Almanza-Merchán *et al.* (2012a), los cuales encontraron que en plantas de *V. vinifera* var. Riesling x Silvaner las hojas 4, 5 y 6 tienen un efecto directo sobre la calidad de los frutos gracias a la capacidad para retener

el mayor contenido de sólidos solubles totales y fotoasimilados traslocándolos hacia el racimo. En este contexto, se realizó un análisis en dichas hojas encontrando como se presentan los valores más altos en la hoja 4 durante el estadio fenológico antesis hasta llegar a envero, alcanzado valores de 12 unidades ICC, a partir de ahí y hasta llegar a la maduración los valores más altos se encontraban en la hoja 6 con valores de 16 unidades ICC, posiblemente causado por que las hojas 4 y 5 estaban entrando en un proceso de senescencia, donde finalmente para la etapa de cosecha la concentración de clorofila en las tres hojas tiende a estabilizarse, con valores cercanos a las 12 unidades ICC (Fig. 3).



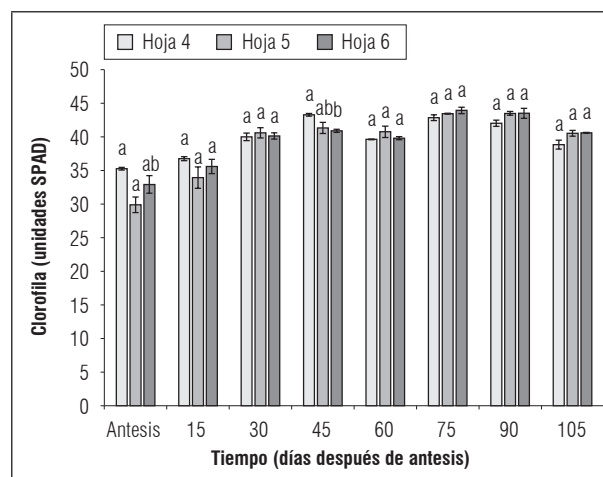
**Figura 3.** Contenido de clorofila cuantificado mediante medidor tipo CCM-200® en hojas de *Vitis vinifera* L. cv. 'Riesling Becker' bajo condiciones de trópico alto. Promedios con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Barras verticales indican error estándar ( $n=3$ ).

Teniendo en cuenta los resultados, se puede recomendar realizar evaluaciones de concentración de clorofila en hojas fotosintéticamente activas de plantas de vid presentes en el tercio medio de la planta, utilizando cualquiera de los dos equipos portátiles mencionados anteriormente. Dichas hojas se encuentran totalmente desarrolladas en los estadios fenológicos antesis, herbáceo y envero.

Resultados similares a los encontrados en el presente estudio fueron hallados por Bertamini y Nedunchezhian (2003), quienes indican cómo se presenta relación directa entre el área foliar, el contenido de clorofila y la absorción de la radiación, la cual va aumentando a medida en que la planta crece y se desarrolla.

Los mismos autores, también indican que en plantas de vid la concentración de clorofila tiene un aumento gradual alcanzando su máximo valor al llegar al estadio fenológico envero, con una disminución hasta llegar a la maduración de los frutos como consecuencia del proceso de senescencia del área foliar de la planta (Young *et al.*, 2007; Callejas *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016).

De acuerdo al contenido de clorofila encontrado en las hojas 4, 5 y 6 cuantificado a través del medidor portátil de clorofila SPAD 502® (Fig. 4), se puede observar la misma tendencia encontrada con el equipo CCM-200®, teniendo la hoja 4 una tendencia creciente en la concentración del contenido de clorofila, donde presenta valores que van desde las 32 a 44 unidades SPAD hasta llegar al inicio del estadio fenológico envero o a los 45 d después de presentarse la antesis, donde posteriormente esta variable no presenta diferencias significativas en las tres hojas. Al iniciar el estadio fenológico de maduración (75 d), la concentración de clorofila se presenta de manera estable en estas hojas, las cuales presentan valores que van de los 40 a 45 unidades SPAD.

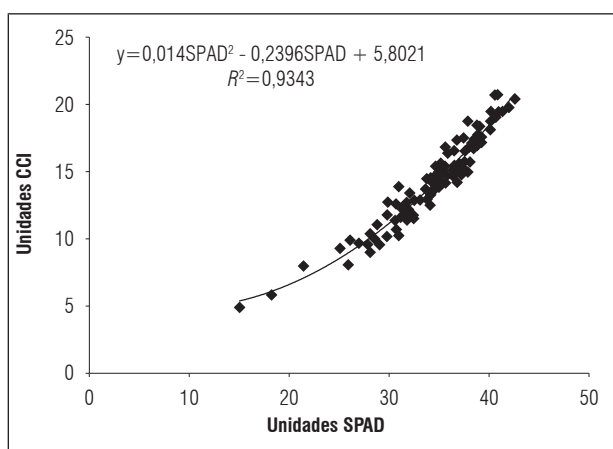


**Figura 4.** Contenido de clorofila cuantificado mediante medidor tipo SPAD 502® en hojas de *Vitis vinifera* L. cv. 'Riesling Becker' bajo condiciones de trópico alto. Promedios con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Barras verticales indican error estándar ( $n=3$ ).

Los resultados encontrados en el presente estudio coinciden con los estudios realizados por Hunter y Visser (1989), quienes observaron que la mayor concentración de clorofila se encuentra en hojas cercanas al racimo durante los periodos de brotación y

floración, así mismo en estas hojas se presentan las tasas más altas de eficiencia fotosintética. De acuerdo con esto, se puede afirmar la relación que existe entre el contenido de clorofila y la fotosíntesis, dado que la presencia de frutos estimula estos dos parámetros en vid (Iacono *et al.*, 1995).

Las mediciones obtenidas con los dos equipos se ajustaron a un polinomio de segundo grado (Fig. 5), determinado por la ecuación para el índice de concentración de clorofila como  $ICC = 0,014SPAD^2 - 0,2396SPAD + 5,8021$ . De acuerdo con modelo polinómico se obtuvo un valor de  $R^2 = 0,9343$  ( $n = 96$ ;  $P \leq 0,0001$ ), el cual indica que existe una alta correlación significativa y positiva entre los dos equipos portátiles de determinación de clorofila. Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con estudios realizados por Callejas *et al.* (2013), al comparar los mismos equipos en dos variedades de uva de mesa.



**Figura 5. Correlación entre los métodos no destructivos CCM-200® y SPAD 502® para la cuantificación del contenido de clorofila en hojas de *Vitis vinifera* L. cv. 'Riesling Becker' bajo condiciones de trópico alto.**

Las desigualdades encontradas en los dos equipos podrían estar relacionadas a las diferencias que poseen los equipos, principalmente a la variedad en las longitudes de onda emitidas y las áreas de evaluación de los equipos, donde el CCM-200 presenta un área de lectura de  $0,71 \text{ cm}^2$  con una longitud de onda que va desde  $940$  a  $660 \text{ nm}$  y  $0,6 \text{ cm}^2$  y  $940$  a  $650 \text{ nm}$  para el SPAD 502. A pesar de que este último posee un área de lectura de más o menos 10 veces menos, autores como Richardson *et al.* (2002) aseguran que no existe una mayor confiabilidad en el CCM-200 respecto

del SPAD, lo cual fue demostrado en hojas de abedul, donde la mayor precisión la obtuvo el SPAD 502.

Con el fin de obtener una mayor confiabilidad y un valor más distintivo, autores como Chang y Robinson (2003) sugieren corregir esta limitación a través de un muestreo más representativo por hoja, el cual posea más de cinco lecturas en cada una, con el fin de controlar la variabilidad dentro de la muestra y creando a su vez medidas más ajustadas.

## CONCLUSIONES

Las evaluaciones realizadas con los medidores de clorofila SPAD 502® y CCM-200® permiten obtener medidas rápidas y confiables, siempre y cuando que generen un número adecuado de mediciones, esto en relación a cada especie. En el presente estudio, cinco mediciones por hoja generaron un modelo ajustado. De igual manera, es importante la elección del estadio fenológico de la planta y del sector en el cual será realizada la medición, principalmente por la alta variabilidad en los contenidos de clorofila que se presentan en relación a las hojas y su filotaxia.

**Conflicto de intereses:** el manuscrito fue preparado y revisado con la participación de los autores, quienes declaran no tener algún conflicto de interés que coloquen en riesgo la validez de los resultados aquí presentados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agronet. 2018. Análisis – Estadísticas, cultivo de Uva Colombia. En: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, <http://www.agronet.gov.co>; consulta: junio de 2018.
- Alizadeh, M., S.K. Singh, V.B. Patel, R.C. Bhattacharya y B.P. Yadav. 2010. In vitro responses of grape rootstocks to NaCl. *Biol. Plant.* 54, 381-385. Doi: 10.1007/s10535-010-0069-0
- Allen, F., T. Center y E. Mattison. 2012. In situ estimates of water hyacinth leaf tissue nitrogen using a SPAD-502 chlorophyll meter. *Aquat. Bot.* 100, 72-75. Doi: 10.1016/j.aquabot.2012.03.005
- Almanza-Merchán, P. 2011. Determinación del crecimiento y desarrollo del fruto de vid (*Vitis vinifera* L.) bajo condiciones de clima frío tropical. Tesis de doctorado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Almanza-Merchán, P., S. González-Merchán y H.E. Balaguera-López. 2012a. La posición de la hoja y su efecto

- sobre la calidad y producción de frutos de vid (*Vitis vinifera* L.) var. Riesling × Silvaner. Rev. Colomb. Cienc. Hortic. 6(1), 9-18. Doi: 10.17584/rcch.2012v6i1.1283
- Almanza-Merchan, P., P. Serrano y G. Fischer. 2012b. Manual de viticultura tropical colombiana. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia.
- Arregui, L., M. Merina y A. Mingo. 2000. Aplicación del medidor portátil en los programas de fertilización nitrogenada en patata. pp. 157-170. En: Memorias Congreso Iberoamericano de Investigación y Desarrollo en Patata. Departamento de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, Pamplona, España.
- Bertamini, M. y N. Nedunchezian. 2003. Photosynthetic functioning of individual grapevine leaves (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir) during ontogeny in the field. Vitis 42(1), 13-17.
- Borhan, M.S., S. Panigrahi, M. Satter y H. Gu. 2017. Evaluation of computer imaging technique for predicting the SPAD readings in potato leaves. Inf. Process. Agr. 4(4), 275-282. Doi: 10.1016/j.inpa.2017.07.005
- Callejas, R., E. Kania, A. Contreras, C. Peppi y L. Morales. 2013. Evaluación de un método no destructivo para estimar las concentraciones de clorofila en hojas de variedades de uva de mesa. Idesia 31(4), 19-26. Doi: 10.4067/S0718-34292013000400003
- Candolfi-Vasconcelos, M. y W. Koblet. 1991. Influence of partial defoliation on gas exchange parameters and chlorophyll content on field grown grapevines mechanisms and limitations of the compensation capacity. Vitis 30, 129-141.
- Cao, Q., Y. Miao, G. Feng, X. Gao, F. Li, B. Liu, S. Yue, S. Cheng, S. Ustin y R. Khosla. 2015. Active canopy sensing of winter wheat nitrogen status: an evaluation of two sensor systems. Comp. Elect. Agric. 112, 54-67. Doi: 10.1016/j.compag.2014.08.012
- Cate, T. y T. Perkins. 2003. Chlorophyll content monitoring in sugar maple (*Acer saccharum*). Tree Physiol. 23, 1077-1079. Doi: 10.1093/treephys/23.15.1077
- Chang, S. y D. Robinson. 2003. Nondestructive and rapid estimation of hardwood foliar nitrogen status using the SPAD-502 chlorophyll meter. Forest Ecol. Manage. 181(3), 331-338. Doi: 10.1016/S0378-1127(03)00004-5
- Cho, Y.Y., S. Oh, M.M. Oh y J.E. Son. 2007. Estimation of individual leaf area, fresh weight, and dry weight of hydroponically grown cucumbers (*Cucumis sativus* L.) using leaf length, width, and SPAD value. Sci. Hortic. 111(4), 330-334. Doi: 10.1016/j.scienta.2006.12.028
- Delegido, J., L. Alonso, G. González y J. Moreno. 2010. Estimating chlorophyll content of crops from hyperspectral data using a normalized area over reflectance curve (NAOC). Int. J. Appl. Earth Obs. Geoinf. 12(3), 165-174. Doi: 10.1016/j.jag.2010.02.003
- Do Amarante, C., O. Zanuzo, A. Miqueloto, C. Steffens, J. Erhart y J. De Almeida. 2009. Quantificação da área e do teor de clorofilas em folhas de plantas jovens de videira 'cabernet sauvignon' mediante métodos não-destrutivos. Rev. Bras. Frutic. 31(3), 680-686. Doi: 10.1590/S0100-29452009000300009
- Elarab, M., A. Tíclavilca., A. Torres-Rua., I. Maslova y M. McKee. 2015. Estimating chlorophyll with thermal and broadband multispectral high resolution imagery from an unmanned aerial system using relevance vector machines for precision agriculture. Int. J. Appl. Earth Obs. Geoinf. 43, 32-42. Doi: 10.1016/j.jag.2015.03.017
- Fanizza, G., L. Ricciardi y C. Bagnulo. 1991. Leaf greenness measurements to evaluate water stressed genotypes in *Vitis vinifera*. Euphytica 55(1), 27-31. Doi: 10.1007/BF00022556
- Hawkins, T., E. Gardiner y G. Comer. 2009. Modeling the relationship between extractable chlorophyll and SPAD-502 readings for endangered plant species research. J. Nat. Conserv. 17(2), 123-127. Doi: 10.1016/j.jnc.2008.12.007
- Hunter, J. y J. Visser. 1989. The effect of partial defoliation, leaf position and developmental stage of the vine on leaf chlorophyll concentration in relation to the photosynthetic activity and light intensity in the canopy of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. S. Afr. J. Enol. Vitic. 10, 67-73. Doi: 10.21548/10-2-2289
- Iacono, F., M. Bertamini, A. Scienza y B. Coombe. 1995. Differential effects of canopy manipulation and shading of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. leaf gas exchange, photosynthetic electron transport rate and sugar accumulation in berries. Vitis 34(4), 201-206.
- Kapotis, G., G. Zervoudakis, T. Veltsistas y G. Salahas. 2003. Comparation of chlorophyll meter readings with leaf chlorophyll concentration in *Amaranthus vltus*: correlation with physiological processes. Russ. J. Plant Physiol. 50(3), 395-397. Doi: 10.1023/A:1023886623645
- Lorenz, D.H., K.W. Eichhorn, H. Blei-Holder, R. Klose, U. Meier y E. Weber. 1994. Phänologische entwicklungsstadien der weinrebe (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*). Vitic. Enol. Sci. 49, 66-70. Doi: 10.1111/j.1755-0238.1995.tb00085.x
- Novoa, R. y A. Villagran. 2002. Evaluación de un instrumento medidor de clorofila en la determinación de niveles de nitrógeno foliar en maíz. Agric. Téc. 62(1), 165-171. Doi: 10.4067/S0365-28072002000100017
- Ocon, P. 2008. Utilización del clorofilometro SPAD 502 para diagnosticar la deficiencia de nitrógeno en sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) bajo distintas dosis de nitrógeno. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria, Managua.
- Pinzón-Sandoval, E., I. Arias-Burgos y G. Cely-Reyes. 2017. Dinámica del crecimiento del fruto de vid (*Vitis vinifera* L.) cv 'Sauvignon' en trópico alto Colombiano. Cult. Cient. 15, 106-115.

- Quijano, M. 2004. Ecología de una conexión solar. De la adoración del sol al desarrollo vitivinícola regional. *Cult. Cient.* 2, 5-9.
- Ramírez, V., A. Moreno y J. López. 2012. Evaluación temprana de la deficiencia del nitrógeno en café y aplicaciones. *Avances Técnicos Cenicafe* 420, 1-8.
- Reyes, J., C. Correa y J. Zúñiga. 2017. Reliability of different color spaces to estimate nitrogen SPAD values in maize. *Comp. Elect. Agric.* 143, 14-22. Doi: 10.1016/j.compag.2017.09.032
- Richardson, A., S. Duigan y G. Berlyn. 2002. Evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytol.* 153, 185-194. Doi: 10.1046/j.0028-646X.2001.00289.x
- Rincón, A. y G. Ligarreto. 2010. Relación entre nitrógeno foliar y el contenido de clorofila, en maíz asociado con pastos en el piedemonte llanero colombiano. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.* 11(2), 122-128. Doi: 10.21930/rcta.vol11\_num2\_art:202
- Rodríguez, M., G. Alcántar, A. Aguilar, J. Etchevers y J. Zantizó. 1998. Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. *Terra Latinoam.* 16(2), 135-141.
- Romano, G., S. Zia, W. Spreer, C. Sanchez, J. Cairns, J. Araus y J. Müller. 2011. Use of thermography for high throughput phenotyping of tropical maize adaptation in water stress. *Comp. Elect. Agric.* 79, 67-74, Doi: 10.1016/j.compag.2011.08.011
- Rosolem, C. y V. Van Mellis. 2010. Monitoring nitrogen nutrition in cotton. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 34(5), 1601-1607. Doi: 10.1590/S0100-06832010000500013
- Sainz, H. y H. Echeverría. 1998. Relación entre las lecturas del medidor de clorofila (Minolta SPAD 502) en distintos estadios del ciclo del cultivo de maíz y el rendimiento en grano. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* 103(1), 37-44.
- Salisbury, F. y C. Ross. 1992. *Fisiología vegetal*. Editorial Iberoamerica, México DF.
- Senger, E., A. Peyrat, M. Martin y J. Montes. 2014. Genetic variation in leaf chlorophyll content of *Jatropha curcas* L. *Ind. Crops Prod.* 58, 204-211. Doi: 10.1016/j.indcrop.2014.04.003
- Steele, M., A. Gitelson y D. Rundquist. 2007. A comparison of two techniques for nondestructive measurement of chlorophyll content in grapevine leaves. *Agron. J.* 100(3), 779-782. Doi: 10.2134/agronj2007.0254N
- Walteros, I.Y., D.C. Molano, P.J. Almanza-Merchán, M. Camacho y H.E. Balaguera-López. 2012. Efecto de la poda sobre la producción y calidad de frutos de *Vitis vinifera* L. var. Cabernet Sauvignon en Sutamarchán (Boyacá, Colombia). *Rev. Colomb. Cienc. Hortic.* 6(1), 19-30. Doi: 10.17584/rcch.2012v6i1.1279
- Wang, H.-F., Z.-G. Huo, G.-S. Zhou, Q.-H. Liao, H.-K. Feng y L. Wu. 2016. Estimating leaf SPAD values of freeze-damaged winter wheat using continuous wavelet analysis. *Plant Physiol. Biochem.* 98, 39-45. Doi: 10.1016/j.plaphy.2015.10.032
- Zulini, L., M. Rubinigg, R. Zorer y M. Bertamini. 2007. Effects of drought stress on chlorophyll fluorescent and photosynthetic pigment in grapevine leaves (*Vitis vinifera* cv. "White Riesling"). *Acta Hortic.* 754, 289-294. Doi: 10.17660/ActaHortic.2007.754.37



# Evaluación del uso de sistema de cobertura de malla en plantas de uva de mesa 'Thompson Seedless'

## Evaluation of the use of a net coverage system in table grape vines, Thompson Seedless variety

MANUEL SALAZAR<sup>1</sup>  
RODRIGO CALLEJAS<sup>2, 4</sup>  
LUIS MORALES<sup>3</sup>

Parronal de uva de mesa en Atacama.

Foto: R. Callejas



### RESUMEN

En Chile, una parte importante de la producción de uva de mesa se produce en el Desierto de Atacama, caracterizándose por un ambiente de altas temperaturas, alta radiación solar y velocidad del viento. Con el objetivo de aminorar los efectos indeseados sobre las plantas y su rendimiento, se evaluó en *Vitis vinifera* L., uva de mesa 'Thompson Seedless', el uso de un sistema de cobertura total conformado por una malla plástica de color blanco y de 80% de porosidad, como protección de las plantas a los efectos del viento y la radiación solar en el Valle del Huasco, Chile. Se evaluaron dos tratamientos, (a) testigo en condiciones naturales y totalmente expuestas y (b) plantas bajo el sistema de cobertura (malla), con 10 repeticiones mediante un diseño completamente aleatorizado. Se evaluaron el crecimiento vegetativo, variables fisiológicas, productivas, así como también la temperatura, humedad relativa, velocidad del viento y radiación solar. El sistema de cobertura redujo la velocidad de viento entre 35 y 55% y la radiación incidente en un 14%. Las condiciones de temperatura y humedad relativa no se alteraron. Los cambios ambientales producidos generan cambios en las plantas protegidas bajo el sistema de cobertura en relación a las plantas expuestas, principalmente en el tamaño de las hojas y porcentaje de brotación, sin embargo, no se detectó efecto sobre los rendimientos y calidad de la fruta.

**Palabras clave adicionales:** vid, efecto del viento, sombreado, déficit de presión de vapor, radiación solar.

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Santiago (Chile). ORCID Salazar, M.: 0000-0001-9997-7070

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agronómicas, Laboratorio de Viticultura, Centro Regional de Estudios Agronómicos y Ambientales-UCHILECREA, Universidad de Chile, Santiago (Chile). ORCID Callejas, R.: 0000-0002-1317-1445

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Recursos Naturales, Universidad de Chile, Santiago (Chile). ORCID Morales, L.: 0000-0001-8083-0706

<sup>4</sup> Autor por correspondencia. [rcalleja@uchile.cl](mailto:rcalleja@uchile.cl)

## ABSTRACT

In Chile, a significant portion of the table grape is produced in the Atacama Desert, characterized by an environment of high temperatures, high solar radiation and the presence of wind. So, with the aim of reducing unwanted effects on plants and yield, the use of a total coverage system was evaluated in *Vitis vinifera* L. Thompson Seedless table grape variety, composed of a white plastic mesh with 80% porosity, in order to protect plants from the effects of wind and solar radiation in Huasco Valley, Chile. Two treatments were performed: (a) control under natural and fully exposed conditions and (b) plants under the cover system (plants under mesh). Vegetative growth, physiological and productive variables, as well as temperature, relative humidity, wind speed and solar radiation were evaluated. The coverage system reduced the wind speed by between 35 and 55%, and the incident radiation was reduced by 14%. The conditions of temperature and relative humidity were not altered. The environmental changes generated agronomic responses in the protected plants under the cover system, as compared to the exposed plants, mainly greater leaf area and sprouting percentage, but no significant differences were observed in the productive parameters or fruit quality.

**Additional key words:** vine, wind effect, shading, vapor pressure deficit, solar radiation.

Fecha de recepción: 30-10-2017 Aprobado para publicación: 30-05-2018

## INTRODUCCIÓN

Debido al cambio climático, la temperatura se irá incrementando en el tiempo, proyectándose 2°C más que en la actualidad, lo que junto al aumento y frecuencia de eventos climáticos, tales como vientos cálidos, olas de calor y menor humedad ambiental, traerá un claro incremento de la demanda atmosférica, exigiendo un mayor consumo de agua de riego. Se estiman períodos más secos para algunas regiones de Chile (5 a un 15%), con un incremento del uso de agua dulce en la industria y, sobre todo, para el consumo humano (CMNUUC, 2016).

En la producción de uva de mesa en Chile y como muchas partes del mundo (Perú, México, Israel, India), superficies importantes se ubican en regiones semiáridas o desérticas, con alta demanda atmosférica, radiación y la velocidad del viento que pueden dañar las plantas y su producción. Se ha constatado, que sistemas de protección contra el viento generan respuestas de importancia agronómica que se traducen en mayores y mejores producciones, disminuyendo el daño mecánico en las plantas y modificando las condiciones de temperatura y humedad relativa de la zona en la cual se ejerce su acción (Onoda y Anten, 2011). Además, al reducir la radiación incidente se generan cambios de consideración agronómica relacionados con calidad de fruta (principalmente color) (Bergqvist *et al.*, 2001), desarrollo vegetativo (Bird *et*

*al.*, 2007) y consumo de agua de riego (Hendrickson *et al.*, 2003).

En India, las mallas de sombreado (factor sombreado 75%) se utilizan donde la temperatura del aire supera 41°C y la humedad cae por debajo del 25%, con el objetivo de proteger brotes jóvenes del estrés severo causado por la luz solar directa intensa (NRC, 2008). En esta misma línea, Shahak *et al.* (2008) corroboran que el cubrimiento de las unidades productivas con mallas fotoselectivas, permite mejorar el rendimiento de los cultivos hortícolas, especialmente en climas extremos de zonas áridas. Según Novello y De Palma (2013), en condiciones semiáridas, limitar la irradiación solar a nivel del dosel puede ser útil para reducir la tasa de transpiración y, por lo tanto, el déficit hídrico del cultivo, pero en el caso de la uva de mesa y a pesar que se ha difundido su uso, todavía se dispone de relativamente poca información sobre sus efectos fisiológicos sobre el funcionamiento de las hojas y la calidad de la uva. Pugliese (2009) encontró que la red blanca (sombreado del 10-15%) redujo el peso de la baya y del racimo y el color de la piel de la baya en 'Red Globe'; resultado atribuido al efecto de la limitación de la luz en la producción de fotoasimilación. Por otro lado, De Palma *et al.* (2012) señalan que los efectos de los materiales plásticos colorantes que cubren no son unívocos; parecen interactuar con la sensibilidad

del cultivar al “efecto de color” y/o con el vigor del genotipo. En Chile existe información, pero no la suficiente en otras especies y en la zona centro sur del país. Rodríguez y Morales (2015), trabajando en arándanos y Bastías *et al.* (2012) en manzano, señalan que esta técnica tiene relevantes efectos sobre la fruta y el desarrollo de la planta, presentándose como un manejo que requiere ser estudiado por los beneficios productivos que genera.

El cultivo de la uva de mesa en la Región de Atacama, Chile, alcanza un 15,3% del total nacional, con aproximadamente 8.000 ha de huertos comerciales (ODEPA, 2010). Bajo estas características climáticas, el cultivo se realiza en condiciones de estrés para las plantas con radiaciones solares en torno a los  $3.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a mediodía solar en verano y ráfagas de viento, lo que genera, entre otras cosas, gran cantidad de fruta de rechazo o no exportable por la generación de color ámbar (amarilla) de los racimos en ‘Thompson Seedless’ (Sáenz-Diez, 2009), daño, manchas (“russet”) y malformaciones.

Debido a los antecedentes señalados, el objetivo de este estudio fue determinar los cambios ambientales, fisiológicos y de desarrollo de las plantas por efecto del uso de un sistema de cobertura con malla de color blanca.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El establecimiento de este ensayo se realizó en plantas de uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) ubicadas en comuna de Alto del Carmen, Región de Atacama ( $28^{\circ}54'56''$  S y  $70^{\circ}16'37''$  W; 1.179 msnm) con ‘Thompson Seedless’ en plena producción, de 25 años de edad, conducidas en sistema de parronal español, con una distancia de plantación de  $3 \times 3$  m, regadas con una línea de goteros separados 1 m, con caudal de  $4 \text{ L h}^{-1}$ . La clasificación climática de la zona es de desierto o árido (Climatología de Chile, 2001). En las temporadas 2009 y 2010, se realizaron dos tratamientos, testigo en condiciones naturales y totalmente expuestas frente a plantas con sistema de cobertura (plantas bajo malla de color blanco y 80% de porosidad), con 10 repeticiones en un diseño completamente aleatorizado e instalado previo a la brotación, en el mes de septiembre de 2009.

Se evaluó la velocidad del viento utilizando el anemómetro de la estación climatológica portátil Weather Capture de Honeywell (Morris Plains, NJ), modelo

TE923W ubicado 0,8 m sobre las plantas. La radiación incidente a mediodía solar (12 a 16 h) con un ceptómetro Accupar, modelo LP-80 (Decagon Devices, Pullmann, WA) con la barra del instrumento ubicada en un ángulo ligeramente superior a los  $90^{\circ}$  (en diagonal). La temperatura del aire ( $^{\circ}\text{C}$ ) y la humedad relativa (%) se midió a 1 m de altura sobre el suelo (Gálvez, 2011), con un higrotermómetro digital, modelo AZ 8701 (AZ Instrument Corp., Taichung, Taiwán). Para evaluar el área foliar, previamente se generó una función predictora a partir del largo de las hojas (Pentón *et al.*, 2006). Para esto se escogieron 100 hojas de plantas ubicadas en el sector expuesto y otras 100 hojas de plantas bajo sistema de cobertura (plantas bajo malla) abarcando el mayor espectro de tamaños de hojas observadas y en laboratorio se les midió el largo de la lámina con regla graduada (mm) y el área en forma individual con el instrumento CI-203 (Laser Area Meter, CID, Washington DC, USA). Luego, para cada planta del ensayo y en forma no destructiva, se seleccionaron cuatro cargadores (de orientación Sur, Oeste, Norte y Este) y en éstos se obtuvo el área foliar, midiendo el largo de todas las láminas de las hojas con regla graduada (mm).

El peso de poda se evaluó en invierno utilizando una pesa electrónica, siguiendo el criterio comercial de poda del parronal. En primavera se registró la calidad de brotación, cuando el brote más desarrollado alcanzó una longitud de 50 cm. Se evaluó el número de yemas brotadas en relación a las yemas totales que contenía los mismos cargadores utilizados para el área foliar. El contenido total de clorofila en hojas se determinó por medios no destructivos (Callejas *et al.* 2013), utilizando un medidor portátil de clorofila (CCM-200; Opti-Science, Hudson, NH, USA) que entrega valores en unidades CCM para calcular el índice del contenido de clorofila (CCI) basado en la absorbancia medida a 660 y 940 nm. Las mediciones se realizaron en tres fechas diferentes una vez estabilizado el crecimiento del tercer brote del cargador, utilizando siempre una hoja de los nudos 2, 4, 6 y 8 del cuarto brote del cargador analizado.

El potencial hídrico xilemático ( $\Psi_x$ ) se evaluó a mediodía solar (14-16 h) en hojas sombreadas que se cubrieron con bolsas plásticas, envueltas con papel de aluminio por un periodo de 90 min. Se retiró la hoja de la planta y sin retirar ésta de la bolsa, se midió inmediatamente el  $\Psi_x$  (MPa) con una cámara de presión tipo Scholander, modelo Pump-up (PMS Instruments, Albany, OR, USA) (Gálvez *et al.*, 2014). La conductancia estomática fue medida en el transcurso

del día, con un porómetro foliar modelo SC-1 (Decagon Devices, Pullman, WA, USA) en una misma hoja y expuesta a la radiación solar, tomando la precaución de no sombrearla al momento de la medición. La conductancia estomática de estas hojas se evaluó en la etapa de llenado de bayas (10 mediciones en el transcurso del día) y una semana antes de la cosecha (7 mediciones en el transcurso del día).

Se evaluó el peso de cada racimo con balanza de sobremesa Veto (Santiago, Chile) de capacidad de 5 kg y una precisión de 2 g. A cosecha, el diámetro de baya con pie de metro electrónico graduado (mm) y el nivel de sólidos solubles con un refractómetro (Veto, Santiago, Chile. Rango 0-32° Brix). Los racimos fueron clasificados según color utilizando la norma requerida para exportación, clasificándola en color verde, crema, ámbar y amarillo (Roa, 2013).

Para todas las variables medidas en este ensayo se utilizó la distribución t de Student para comparar los valores promedios de ambos tratamientos. Se utilizaron los programas computacionales MINITAB® v15.0 e InfoStat®. Para verificar el supuesto de normalidad se utilizó la prueba de Anderson-Darling y para comprobar la homogeneidad de varianzas, se utilizó la prueba de Barlett.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Velocidad del viento

Dentro de los parámetros ambientales y tal como se puede observar en la tabla 1, el sistema de cobertura redujo la velocidad del viento entre un 40 y 55% y la velocidad de las ráfagas de viento entre un 35 y 55%.

De acuerdo a McLeod (2006), las velocidades del viento que se registraron en el sector expuesto (testigo) se

clasifican como viento moderado, el cual provoca que se agiten las ramas y se muevan las hojas lo que es conocido como “ramaleo”. En el sector bajo el sistema de cobertura se considera como viento débil, el que solo provoca una moderada agitación de las hojas de las plantas, no produciendo un movimiento importante de las ramas. En las evaluaciones realizadas por Whitehead (1957), con plántulas de *Helianthus annuus*, velocidades de viento de 14,8; 8,5, 4,03 y 0,44 m s<sup>-1</sup> produjeron plantas con menor área foliar y menor peso seco total a medida que se aumentó la velocidad de viento. La diferencia de área foliar y peso seco total, entre las plantas sometidas a 4,03 y 0,44 m s<sup>-1</sup>, fue de un 40% mayor en área foliar y 42,4% en peso seco en las últimas. En la tabla 1, se puede observar que el tratamiento de plantas expuestas están sometidas a velocidades de viento sobre los 4 m s<sup>-1</sup> y como se discute posteriormente en la información de la tabla 2, sí se produce la respuesta esperada respecto de la reducción de área foliar.

### Radiación solar

A mediodía solar, la radiación solar incidente en el sector donde se ubicaron las plantas expuestas, presentó una intensidad de 2.960  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y en el sector bajo el sistema de cobertura de 2.490  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Estos valores de radiación incidente son muy críticos para las plantas ya que, como señalan Hendrickson *et al.* (2003), sobre los 1.500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  existe una alta probabilidad de fotoinhibición, generándose un desbalance entre los mecanismos fotoquímicos captadores de energía y aquellos que la disipan, traduciéndose en una pérdida de la eficiencia fotosintética en las hojas afectadas, principalmente las que se encuentran en la capa superior en el parronal (Ferguson *et al.*, 2011). Por otro lado, la malla utilizada como sistema de cobertura de un 20% de porosidad, redujo la radiación incidente en las plantas en un 14%. Al respecto, en un estudio realizado en la zona de Andalucía en que se utilizaron nueve tipos de malla de uso agrícola

**Tabla 1. Descripción de la intensidad del viento entre el sector con y sin protección del viento en uva de mesa ‘Thompson Seedless’. Los porcentajes de reducción de la velocidad de viento y de las ráfagas corresponden a los rangos registrados en todas las campañas de evaluación.**

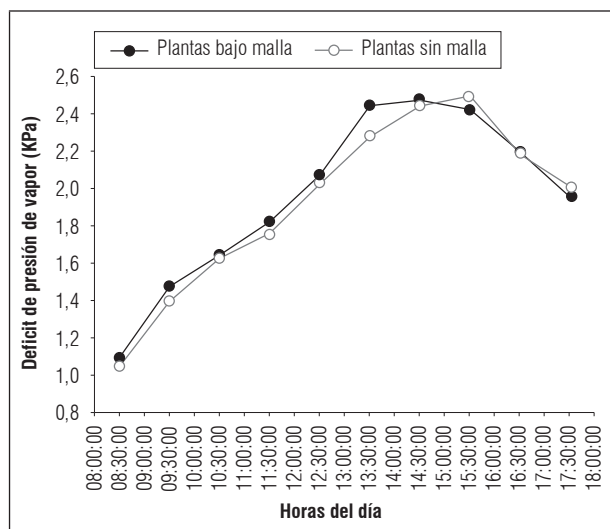
Tratamiento	Reducción de la velocidad del viento respecto del sector de las plantas expuestas (%)	Reducción de la velocidad de las ráfagas de viento respecto del sector de las plantas expuestas (%)	Promedio $\pm$ desviación estándar de velocidad de viento (13:00 a 19:00 h) (m s <sup>-1</sup> )	Promedio $\pm$ desviación estándar de velocidad ráfagas de viento (13:00 a 19:00 h) (m s <sup>-1</sup> )
Plantas bajo malla	40 a 55	35 a 55	2,69 $\pm$ 0,35	3,69 $\pm$ 1,52
Plantas expuestas	-	-	4,77 $\pm$ 1,00	5,70 $\pm$ 1,57



(Romero-Gómez *et al.*, 2012), se concluyó, que mallas de color blanco presentan una mayor transmisividad de la radiación solar comparado con mallas color verde y negro.

### Déficit de presión de vapor

El déficit de presión de vapor (DPV) no presentó diferencias estadísticamente significativas en las distintas horas del día (Fig. 1), dejando de manifiesto que el sistema de protección no altera las condiciones de humedad relativa y temperatura del sector que protege. Esto se debería a la alta porosidad de la malla utilizada para construir el sistema de cobertura en la zona bajo estudio, pues como lo señala Guyot (1989), entre mayor es la porosidad de una malla cortaviento, menor es el cambio que produce en un determinado microclima. En este estudio, la porosidad fue del 80% lo que es considerado como permeable o abierta (Scarabino *et al.*, 2007), razón por la cual, su preferencia por los productores de la zona para no reducir excesivamente la luz incidente en las plantas y pueda generar probables problemas con la fertilidad de las yemas. Además, las mallas menos permeables requieren de una mayor infraestructura para resistir las ráfagas de vientos, encareciendo su instalación.



**Figura 1.** Déficit de presión de vapor en el transcurso del día, en el sector bajo sistema de cobertura y en el sector de plantas expuestas (noviembre), evaluado debajo del follaje para uva de mesa 'Thompson Seedless'. Promedios con letras distintas, en la hora del día, indican diferencia significativa según la prueba t de Student ( $P \leq 0,05$ ),  $n = 10$ .

### Área foliar

El área foliar presentó diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0,05$ ) (Tab. 2), siendo mayor en las plantas bajo el sistema de cobertura de mallas que en las plantas expuestas, considerando con lo publicado por Onoda y Anten (2011) en sus trabajos en Plantago. La causa de la reducción del área de las hojas se debe a un cambio en la distribución de asimilados, desde la producción de material foliar a la producción de tallos y raíces, mejorando el anclaje de la planta y aumentando la resistencia mecánica (Onoda y Anten, 2011), señalándose que comprender la respuesta de la planta al viento es complejo, teniendo en cuenta que este factor no solo implica estrés mecánico, sino que también afecta el microclima de la hoja. Otros estudios señalan que plantas expuestas a altas velocidades de viento presentan hojas más gruesas en relación a una menor exposición al viento (Bird *et al.*, 2007), así como, un mayor nivel de rompimiento de las hojas debido al "ramaleo" lo que también conduce a reducir el área foliar (McLeod, 2006). Por otra parte, es factible que el mayor sombreado generado por la malla utilizada como protección del viento, produce un mayor crecimiento de las hojas que se aclimataron bajo esta condición de sistema de cobertura, tal como lo señala Sáenz-Diez (2009), quien encontró que hojas de vid 'Thompson Seedless' sometidas a dos condiciones de sombreado, con cubiertas que presentaron una transmisividad de luz de 46 y 20%, mostraron un aumento de área foliar de un 20% y 50%, respectivamente, en comparación a hojas sin estructura de sombreado.

**Tabla 2.** Área foliar para plantas de uva de mesa 'Thompson Seedless' bajo el sistema de protección y expuestas.

Tratamiento	Área foliar (cm <sup>2</sup> )
Plantas bajo malla	82,25 ± 7,19 a
Plantas expuestas	75,04 ± 5,43 b

Promedios con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba t de Student ( $P \leq 0,05$ ); ± indica desviación estándar.

### Peso de poda

El peso de poda no presentó diferencias significativas al comparar ambos tratamientos (Tab. 3). Esto no coincide con los resultados de Dry *et al.* (1989), en donde las vides del cv. Cabernet Franc protegidas del efecto del viento presentaron un 55% mayor de peso



de poda comparado con las expuestas, debido a una mayor tasa de crecimiento vegetativo. Es importante tener en cuenta, que el peso de poda responde a una suma de factores externos e intrínsecos de la planta (Walteros *et al.*, 2012) y que en este caso sería el resultado del crecimiento y desarrollo durante 25 años (edad de las plantas), por lo tanto, considerando que al momento de la evaluación el sistema de cobertura llevaba sobre el patrón solamente 18 meses desde su instalación, el efecto ejercido sobre este parámetro requeriría de un mayor tiempo de protección para que los cambios se manifiesten.

**Tabla 3. Peso de poda para plantas de uva de mesa 'Thompson Seedless' bajo el sistema de protección y expuestas.**

Tratamiento	Peso de poda (kg)
Plantas bajo malla	2,2±0,6 a
Plantas expuestas	2,6±0,5 a

Promedios con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba t de Student ( $P \leq 0,05$ );  $\pm$  indica desviación estándar.

Para el caso del estudio y de acuerdo con la tabla 3, las plantas son consideradas de vigor medio, probablemente por efecto del viento a través del tiempo. Al respecto, Márquez *et al.* (2007) en los cv. Perlette, Flame Seedless y Sugraone, indican que plantas de vigor bajo y sobre pie franco presentan pesos de poda menores a 2 kg.

### Porcentaje de brotación

Las plantas bajo malla presentaron un porcentaje de brotación significativamente mayor que las plantas expuestas (Tab. 4). Dry *et al.* (1989), señalan que vides protegidas del viento presentan mayores rendimientos que vides expuestas, debido principalmente a una mayor y mejor brotación. Por otra parte, Ferguson *et al.* (2011) indican que la temperatura juega un rol fundamental en este aspecto, la que debiera ser evaluada en las semanas cercanas a brotación para determinar la influencia de este factor en cuanto a la brotación bajo estas condiciones. Otra posibilidad de la menor brotación podría explicarse por una mayor deshidratación de las yemas expuestas al viento, situación que se aminora en el tratamiento con malla. Los efectos del viento sobre el aumento de la deshidratación de tejidos vegetales ha sido demostrado en hojas de *Trifolium* spp. y frutos de *Malus* spp., pues el viento remueve las ceras epicuticulares que son la

principal barrera a la deshidratación (Van Gardingen y Grace, 1991), afectando de igual forma a las yemas de las plantas.

**Tabla 4. Nivel de brotación para plantas de uva de mesa 'Thompson Seedless' bajo el sistema de protección y expuestas.**

Tratamiento	Brotación (%)
Plantas bajo malla	73,1 a
Plantas expuestas	63,8 b

Promedios con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba t de Student ( $P \leq 0,05$ ).

### Índice de clorofila

El índice del contenido de clorofila en hojas, aumentó desde octubre (brotación) hasta enero (cosecha). No se presentó diferencias entre los tratamientos para cada fecha de evaluación (Tab. 5). Bertamini *et al.* (2003), señalan que en condiciones de alta iluminación ocurre reducción de la clorofila en las hojas, debido a su degradación por acción de la enzima clorofilasa. Además, Pallioti *et al.* (2000) mencionan que las hojas desarrolladas bajo condiciones de sombreado tienen mayor concentración de clorofila. Lo anterior no se evidenció en ambos tratamientos, para ninguna de las fechas de medición, debido probablemente a la alta porosidad de la malla (80%) permitiendo un alto paso de luz que no manifestó la respuesta esperada.

**Tabla 5. Índice de clorofilas en hojas adultas para plantas de uva de mesa 'Thompson Seedless' bajo el sistema de protección y expuestas.**

Fecha de evaluación	Tratamiento	ICC
27-oct (cuaja)	Plantas bajo malla	11,22 a
	Plantas expuestas	11,59 a
22-nov (enero)	Plantas bajo malla	15,88 a
	Plantas expuestas	15,84 a
11-ene (cosecha)	Plantas bajo malla	17,10 a
	Plantas expuestas	16,95 a

Promedios con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba t de Student ( $P \leq 0,05$ ).

### Potencial hídrico xilemático

Respecto al potencial hídrico xilemático, se obtuvieron diferencias significativas, tanto en las mediciones realizadas en la etapa de llenado de bayas (a fines de noviembre) como previo a la cosecha (a mediados de

diciembre) (Tab. 6). El potencial hídrico xilemático ha sido propuesto como un indicador estándar para determinar el estado hídrico de las plantas (Ferreira *et al.*, 2002), pues como señalan Choné *et al.* (2001) es el resultado de la transpiración de la planta, la conductividad hidráulica del suelo y la interacción suelo-raíz, indicando la capacidad que tiene la planta para conducir agua desde el suelo a la atmósfera. Laker (2004) afirma, que el estado hídrico de la planta es afectado por condiciones ambientales como luz, temperatura, humedad relativa, velocidad de viento y DPV. Las plantas expuestas estuvieron sometidas a mayores intensidades de radiación solar lo que conlleva a un mayor déficit hídrico que se traduce en menores potenciales hídricos xilemáticos y según Anten *et al.* (2010), hojas expuestas a mayores intensidades de

viento, como es el caso de las plantas expuestas, presentan una mayor tasa de liberación de vapor de agua impuesto por un mayor DPV en la capa límite. De esta manera, las condiciones generadas por el sistema de cobertura, de disminución de la radiación incidente y velocidad de viento, se tradujeron en un mayor potencial xilemático en las plantas protegidas, pero siempre dentro de rangos aceptables del manejo del riego para ambos tratamientos (Gálvez *et al.*, 2012).

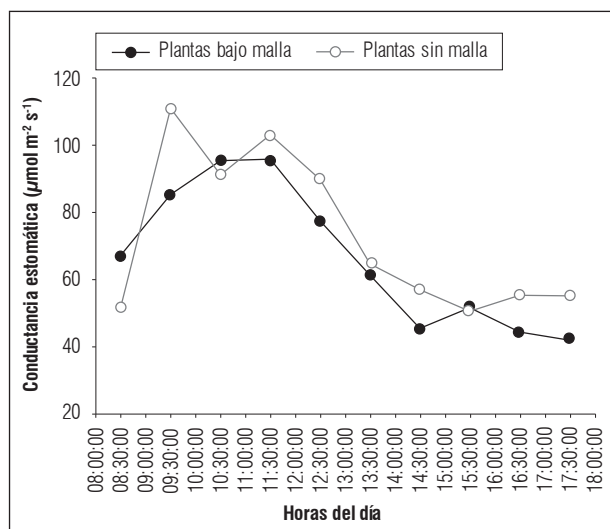
### Conductancia estomática

Con respecto a la conductancia estomática (Fig. 2 y 3), se presentaron diferencias significativas con mayores resultados en plantas expuestas. Dado que, la

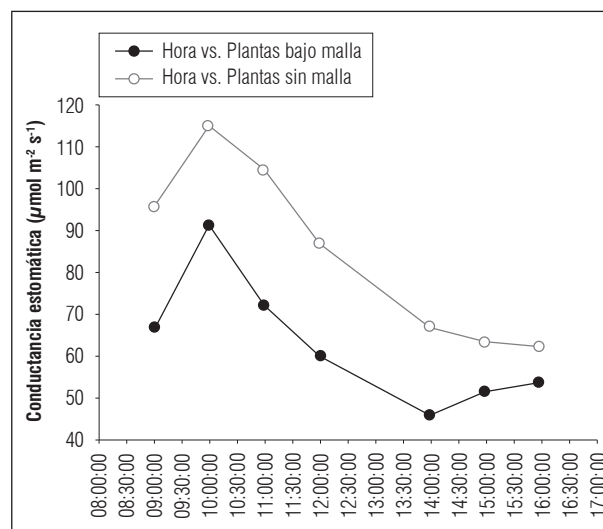
**Tabla 6. Potencial hídrico xilemático y déficit de presión de vapor para plantas de uva de mesa 'Thompson Seedless' bajo el sistema de protección y expuestas, medidos a mediodía solar en la etapa de llenado de bayas (25 de noviembre) y una semana previo a la cosecha (8 de diciembre).**

	Llenado de bayas		Previo a cosecha	
	Potencial xilemático (MPa)	DPV (KPa)	Potencial xilemático (MPa)	DPV (KPa)
Plantas bajo malla	-0,73±0,03 b	2,7±0,2 a <sup>i</sup>	-0,68±0,02 b <sup>i</sup>	2,4±0,2 a <sup>i</sup>
Plantas expuestas	-0,78±0,02 a	2,5±0,1 a	-0,73±0,04 a	2,4±0,2 a

Promedios con letras distintas, en columnas, indican diferencia significativa según la prueba t de Student ( $P \leq 0,05$ );  $\pm$  indica desviación estándar.



**Figura 2. Conductancia estomática para plantas de uva de mesa 'Thompson Seedless' bajo el sistema de protección y expuestas en el transcurso del día, en la etapa de llenado de bayas. Promedios con letras distintas, en sentido vertical, indican diferencia significativa según la prueba t de Student ( $P \leq 0,05$ ). Noviembre de 2010.**



**Figura 3. Conductancia estomática para plantas de uva de mesa 'Thompson Seedless' bajo el sistema de protección y expuestas en el transcurso del día, 1 semana previa a cosecha. Promedios con letras distintas, en sentido vertical, indican diferencia significativa según la prueba t de Student ( $P \leq 0,05$ ). Diciembre de 2010.**

conductancia estomática representa la velocidad a la cual se produce el flujo de agua transpirada desde las hojas hacia la atmósfera a través de los estomas, en la medida que los estomas se mantengan abiertos la velocidad será mayor, por el contrario, si existe déficit hídrico estos tienden a cerrarse provocando una disminución drástica de la conductancia estomática (Riveros, 2002). Los resultados obtenidos por Sáenz-Diez (2009) indican que hojas bajo una condición de 80% de sombreado presentan menores tasas de conductancia estomática que aquellas que se encuentran en una condición de 54% de sombreado y plantas totalmente expuestas a la radiación solar. Lo anterior coincide con este estudio, a pesar que el sistema de cobertura que se utilizó genera solamente un 14% de sombreado, considerando un valor bajo comparado con la malla utilizada en el estudio desarrollado por Sáenz-Diez (2009) (80 y 54% de sombreado).

### Parámetros productivos

No se presentaron diferencias significativas en el rendimiento total por planta, peso de los racimos, sólidos solubles, diámetro de bayas y fruta de rechazo (Tab. 7). Por el contrario, se menciona que plantas de vid más expuestas al viento presentan menores rendimientos que plantas protegidas (Bird *et al.*, 2007), debido principalmente a interrupción de cuajado de bayas, menores tasas de conductancia estomática y daño mecánico. De igual manera, Carey *et al.* (2007) no encontraron diferencias en relación al rendimiento por planta, peso de bayas y sólidos solubles de vides expuestas al efecto del viento comparado con vides

protegidas, indicando que estos parámetros productivos se afectan dependiendo de la diferencia de intensidad de viento y tiempo de exposición de las plantas, lo que queda de manifiesto en este estudio, el cual duró solamente 18 meses.

### Color de bayas

No se detectaron diferencias entre los tratamientos en ninguna de las clasificaciones de color (Tab. 8). Greer *et al.* (2014) afirman que las bayas expuestas a la radiación solar pierden su color verde tornándose amarillas antes que las bayas no expuestas. En este sentido, Suazo (1999) plantea que los racimos 'Thompson Seedless' expuestos a condiciones de sol directo se tornan más amarillos, pudiendo llegar a colores dorados. Claramente el efecto de la cubierta de malla no fue suficiente para disminuir el exceso de luminosidad que recibe el racimo, ni el porcentaje de fruta color ámbar, probablemente por baja retención de luz directa (14%).

## CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones en que se realizó el estudio, se concluye que la temperatura y humedad relativa no se alteraron por el uso de un sistema de cobertura de malla de 80% de porosidad; el sistema de cobertura reduce la velocidad de viento entre un 35 y 55% y la radiación incidente en un 14%. Además, las modificaciones generadas por el sistema de cobertura producen un mayor área foliar, mayor porcentaje de brotación, menores tasas de conductancia estomática

**Tabla 7. Evaluación de parámetros productivos para plantas de uva de mesa 'Thompson Seedless' bajo el sistema de protección y expuestas.**

Tratamiento	Peso racimo (g)	Sólidos solubles (°Brix)	Diámetro bayas (mm)	Fruta de rechazo por planta (kg)	Rendimiento promedio por planta (kg)
Plantas bajo malla	610,9±103,2 a	19,6±0,7 a <sup>1</sup>	18,17±1,01 a <sup>1</sup>	4,00±1,23 a	18,16±5,57 a <sup>1</sup>
Plantas expuestas	622,2±44,5 a	19,3±0,6 a	18,12±0,44 a	4,89±0,92 a	18,41±3,95 a

Promedios con letras distintas, en la misma columna, indican diferencia significativa según la prueba t de Student ( $P \leq 0,05$ );  $\pm$  indica desviación estándar.

**Tabla 8. Clasificación de los racimos de acuerdo a la norma de exportación para plantas de uva de mesa 'Thompson Seedless' bajo el sistema de protección y expuestas.**

Tratamiento	Racimos color verde (%)	Racimos color crema (%)	Racimos color ámbar (%)	Racimos color amarillo (%)
Plantas bajo malla	9 a	59 a	28 a	4 a
Plantas expuestas	6 a	58 a	33 a	3 a

Promedios con letras distintas, en sentido vertical, indican diferencia significativa según la prueba t de Student ( $P \leq 0,05$ ).

y mayores potenciales xilemáticos en las plantas protegidas en relación a las plantas expuestas. También, no se detectaron diferencias en los parámetros productivos y la calidad de la fruta.

**Conflicto de intereses:** el manuscrito fue preparado y revisado con la participación de los autores, quienes declaran no tener algún conflicto de interés que coloquen en riesgo la validez de los resultados aquí presentados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anten, N., R. Alcalá-Herrera, F. Schieving e Y. Onoda. 2010. Wind and mechanical stimuli differentially affect leaf traits in *Plantago major*. *New Phytol.* 188, 554-564. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03379.x
- Bastías R., L. Manfrini y L. Corelli-Grappadelli. 2012. Exploring the potential use of photo-selective nets for fruit growth regulation in apple. *Chil. J. Agric. Res.* 72(2), 224-231.
- Bergqvist, J., N. Dokoozlian y N. Ebisuda. 2001. Sunlight exposure and temperatura effects on Berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the Central Joaquin Valley California. *Am. J. Enol. Viticult.* 52, 1-7.
- Bertamini, M. y N. Nedunchezian. 2003. Photosynthetic functioning of individual grapevine leaves (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) during ontogeny in the field. *Vitis* 42, 12-17.
- Bird, P., T. Jackson, G. Kearny y A. Roach. 2007. Effects of windbreak structure on shelter characteristics. *Aust. J. Exp. Agr.* 47, 727-737. Doi: 10.1071/EA06086
- Callejas, R., E. Kania, A. Contreras, C. Peppi y L. Morales. 2013. Evaluación de un método no destructivo para estimar las concentraciones de clorofila en hojas de variedades de uva de mesa. *Idesia* 31(4), 19-26. Doi: 10.4067/S0718-34292013000400003
- Carey, V., W. Piennar y E. Archer. 2007. Efecto del viento en el funcionamiento de la vid en Stellenbosch, Sudáfrica. *Rev. Enol.* 3, 1-11.
- Choné, X., C. Van Leeuwen, D. Dubourdieu y J. Pierre. 2001. Stem water potential is a sensitive indicator of grapevine water status. *Ann. Bot.* 87, 477-483. Doi: 10.1006/anbo.2000.1361
- Climatología de Chile. 2001. Meteorología. Dirección meteorológica de Chile, Santiago.
- CMNUUC (Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático). 2016. Conferencia de la ONU sobre cambio climático. Bonn, Alemania.
- De Palma, L., L. Tarricone, G. Vox, P. Limosani, M. de Michele y V. Novello. 2012. Semiforzatura precoce con film colorati: fisiologia delle viti e qualità del prodotto. *Riv. Frutt.* 74(1-2), 32-38.
- Dry, P., S. Reed y G. Potter. 1989. The effect of wind on the performance of Cabernet Franc grapevines. *Acta Hort.* 240, 143-146. Doi: 10.17660/ActaHortic.1989.240.24
- Ferguson, J., J. Tarara, L. Mills, G. Grove y M. Keller. 2011. Dynamic thermal time model of cold hardiness for dormant grapevine buds. *Ann. Bot.* 107, 389-396. Doi: 10.1093/aob/mcq263
- Ferreira, R., G. Selles, J. Peralta y J. Valenzuela. 2002. Effect of water stress applied at different development periods of Cabernet Sauvignon grapevine on production and wine quality. *Acta Hort.* 646, 27-33. Doi: 10.17660/ActaHortic.2004.664.27
- Gálvez, R. 2011. Evaluación del uso conjunto del potencial hídrico xilemático y el déficit de presión de vapor en el manejo del riego en vides de mesa. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Santiago.
- Gálvez, R., R. Callejas, G. Reginato y M.C. Peppi. 2014. Irrigation schedule on table grapes by stem water potential and vapor pressure deficit allows to optimize water use. *Ciência Téc. Vitiv.* 29(2) 60-70. Doi: 10.1051/ctv/20142902060
- Greer, D. y M. Weedon. 2014. Temperature-dependent responses of the berry developmental processes of three grapevine (*Vitis vinifera*) cultivars. *New Zeal. J. Crop Hort. Sci.* 42, 233-246. Doi: 10.1080/01140671.2014.894921
- Guyot, G. 1989. Les effets aérodynamiques et microclimatiques des brise-vent et des aménagements régionaux. pp. 485-520. En: Reifsnnyder, W.S. y T.O. Darnhofer (eds.). *Meteorology and agroforestry*. ICRAF, Nairobi, Kenia.
- Hendrickson, L., M. Ball, C. Osmond, R. Furbank y W. Soon-Chow. 2003. Assessment of photoprotection mechanisms of grapevines at low temperature. *Funct. Plant Biol.* 30, 631-642. Doi: 10.1071/FP02114
- Laker, M. 2004. The effect of atmospheric and soil conditions on the grapevine water status. Tesis de maestría. Faculty of AgriSciences, Stellenbosch University, Stellenbosch, Sudáfrica.
- Márquez, J., G. Martínez y H. Núñez. 2007. Portainjerto, fertilidad de yemas y producción de variedades de uva de mesa. *Rev. Fitotec. Mex.* 30(1), 89-95.
- McLeod, C. 2006. Cortavientos en agricultura. Publicaciones INIA Kampenaike, Punta Arenas, Chile.
- Novello, V. y L. de Palma. 2013. Shade nets on table grapes. pp. 133-144. En: Proc., 1<sup>er</sup> Simposium Internacional de Vid. 24 y 25 de enero 2013. Hermosillo, México.
- NRC (National Research Centre for Grapes). 2008. Use of shade nets for early sprouting in vineyards after backward pruning. En: Annual Report 2007-08. Pune, India.

- ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias). 2010. Superficie plantada y producción estimada país año 2010. En: <http://www.odepa.cl/servlet/articulos>; consulta: octubre de 2017.
- Onoda, Y. y N.P.R. Anten. 2011. Challenges to understand plant responses to wind. *Plant Signal. Behav.* 6(7), 1057-1059. Doi: 10.4161/psb.6.7.15635
- Pallioti, A., A. Cartechini and F. Ferranti. 2000. Morpho-anatomical and physiological characteristics of primary and lateral shoots leaves of Cabernet Franc and Trebbiano Toscano grapevines under two irradiance regimes. *Am. J. Enol. Viticult.* 51, 122-130.
- Pentón, G., W. Torres y G. Martín. 2006. Estimación del área foliar a partir de observaciones morfológicas convencionales en *Morus alba* var. Acorazonada. *Pastos y Forrajes* 29, 247-251.
- Pugliese M.B. 2009. Influencia del deshoje y despunte en el desarrollo del color y otras variables de calidad en la cultivar Red Globe bajo malla antigranizo. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.
- Riveros, R. 2002. Efectos del riego deficitario controlado sobre la producción y la calidad del fruto en uva de mesa (sultanina). Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Santiago.
- Roa, A. 2013. Influencia de la exposición del racimo a la radiación solar y su efecto sobre la pérdidas de calidad por color en la variedad Thompson Seedless. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Santiago.
- Rodríguez, M. y D. Morales. 2015. Efecto de mallas sombreadoras sobre la producción y calidad de frutos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Brigitta. *Scientia Agrop.* 6(1), 41-50. Doi: 10.17268/sci.agropecu.2015.01.04
- Romero-Gámez, M., E. Suárez-Rey y T. Soriano. 2012. Características radiativas de nueve mallas de uso agrícola. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla, España.
- Shahak, Y., K. Ratner, Y.E. Giller, N. Zur, E. Or, E.E. Gussakovsky, R. Stern, P. Sarig, E. Raban, E. Harcavi, I. Doron e Y. Greenblat-Avron. 2008. Improving solar energy utilization, productivity and fruit quality in orchards and vineyards by photoselective netting. *Acta Hort.* 772, 65-72. Doi: 10.17660/ActaHortic.2008.772.7
- Sáenz-Diez, D. 2009. Respuesta fotosintética de hojas de vid desarrolladas a diferentes condiciones de luz. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Santiago.
- Scarabino A., S. Delnero, M. Camocardi y M. Giannecchini. 2007. Resistencia aerodinámica de telas y mallas de distinta porosidad. En: Actas de la XXX Reunión de ASADES. 13-16 nov. 2007. San Luis, Argentina.
- Suazo, J. 1999. Evaluación de un protector solar en uva de mesa (*Vitis vinifera*) cv. Thompson Seedless. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Chillán, Chile.
- Van Gardingen, P. y J. Grace. 1991. Plants and wind. *Adv. Bot. Res.* 18, 189-253. Doi: 10.1016/S0065-2296(08)60023-3
- Walteros, I.Y., D.C. Molano, P.J. Almanza-Merchán, M. Camacho y H.E. Balaguera-López. 2012. Efecto de la poda sobre la producción y calidad de frutos de *Vitis vinifera* L. var. Cabernet Sauvignon en Sutamarchán (Boyacá, Colombia). *Rev. Colomb. Cienc. Hortic.* 6(1), 19-30. Doi: 10.17584/rcch.2012v6i1.1279
- Whitehead, F.H. 1957. Wind as a factor in plant growth. pp. 84-95. En: Hudson J.P. (ed.). *Control of the plant environment*. Butterworth Scientific, London, UK.



# Efecto parasítico de *Trichogramma* y del depredador *Chrysoperla* sobre huevos de *Compsus viridivittatus*, plaga de *Vitis vinifera*, en laboratorio

Parasitism of *Trichogramma* and predation of *Chrysoperla* on *Compsus viridivittatus* eggs, a *Vitis vinifera* pest, under laboratory conditions

DIEGO ALONSO PINZÓN-HAMÓN<sup>1</sup>  
JOHN WILSON MARTÍNEZ-OSORIO<sup>2,3</sup>  
MAYERLY ALEJANDRA CASTRO-LÓPEZ<sup>2</sup>

Individuos del picudo, *C. viridivittatus*,  
confinados en condiciones de laboratorio, UPTC,  
Tunja (Colombia).

Foto: D.A. Pinzón-Hamón



## RESUMEN

Se evaluaron los potenciales parasíticos de *Trichogramma exiguum* y *Trichogramma pretiosum* y del depredador *Chrysoperla carnea* sobre huevos del picudo *Compsus viridivittatus*, plaga presente en cultivos de vid en Boyacá, Colombia. En ensayos con *T. exiguum* y *T. pretiosum*, se emplearon grupos de 240 huevos del picudo expuestos a densidades de 0, 15, 30 y 45 parasitoides. En el ensayo con *C. carnea* se empleó una larva de segundo instar del depredador y densidades de presa de 80, 160 y 240 huevos de *C. viridivittatus*. Los ensayos se establecieron en condiciones de laboratorio ( $18\pm 2^\circ\text{C}$  y  $60\pm 5\%$  HR) con un diseño experimental completamente al azar. En los ensayos con *T. exiguum* y *T. pretiosum* el mayor porcentaje de parasitismo se obtuvo con una densidad de 45 parasitoides (69,4 y 82,5%, respectivamente). Se estableció que *T. pretiosum* fue más efectivo, parasitando huevos de *C. viridivittatus* que *T. exiguum*, originando una emergencia de larvas inferior al 13% y parasitismo superior al 70%. El ensayo con *C. carnea* evidenció que el mayor nivel de consumo (85,8%) se obtuvo con una cantidad de presas de 80 huevos de *C. viridivittatus*. No se presentó emergencia de los parasitoides tanto en los huevos expuestos a *T. exiguum* como *T. pretiosum*, atribuible a las condiciones ambientales y/o características intrínsecas del huésped *C. viridivittatus*. Los entomófagos evaluados originaron porcentajes de mortalidad en huevos del picudo, superiores al 50%, sugiriendo su posterior evaluación en campo para establecer un posible uso en programas de control biológico de *C. viridivittatus* en vid en Boyacá.

<sup>1</sup> Comité de Cafeteros de Santander, Bucaramanga (Colombia). ORCID Pinzón-Hamón, D.A.: 0000-0002-3676-7399

<sup>2</sup> Grupo Manejo Biológico de Cultivos, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Tunja (Colombia). ORCID Martínez-Osorio, J.W.: 0000-0002-5742-8062; ORCID Castro-López, M.A.: 0000-0003-1151-2514

<sup>3</sup> Autor para correspondencia. [john.martinez@uptc.edu.co](mailto:john.martinez@uptc.edu.co)

**Palabras clave adicionales:** control biológico, depredación, parasitismo, vid.

## ABSTRACT

The parasitic potential of *Trichogramma exiguum* and *Trichogramma pretiosum* and the predatory effect of *Chrysoperla carnea* were evaluated on *Compsus viridivittatus* eggs, an insect pest in grape fields in Boyaca, Colombia. The *T. exiguum* and *T. pretiosum* tests used 240 eggs groups exposed to 0, 15, 30 and 45 parasitoids densities. In the *C. carnea* test, a second instar larva was placed with prey densities of 80, 160 and 240 *C. viridivittatus* eggs. A completely randomized design was used under laboratory conditions ( $18\pm 2^{\circ}\text{C}$  and  $60\pm 5\%$  RH). In the trials with *T. exiguum* and *T. pretiosum*, the highest percentages of parasitism were obtained with the 45 parasitoid density (69.4% and 82.5%, respectively). It was established that *T. pretiosum* was more effective in the parasitism of *C. viridivittatus* than *T. exiguum*, resulting in larvae emergence under 13% and parasitism over 70%. The test with *C. carnea* showed that the highest consumption percentage (85.8%) was obtained with the 80 *C. viridivittatus* egg density. There was no emergence of parasitoids from the eggs parasitized by *T. exiguum* and *T. pretiosum*, probably because of the environmental conditions and/or *C. viridivittatus* host intrinsic characteristics. The tested entomophagous species showed over 50% *C. viridivittatus* egg mortality, suggesting that they can be used in future field tests in grape vine crops in order to observe their potential in *C. viridivittatus* biological control programs in Boyaca.

**Additional key words:** biological control, parasitism, predation, grape.

Fecha de recepción: 02-03-2018 Aprobado para publicación: 30-05-2018

## INTRODUCCIÓN

En Colombia el cultivo de uva está presente en varias regiones y en el departamento de Boyacá se ubica en zonas de clima frío localizadas en las provincias del alto Ricaurte, Sugamuxi, Tundama, Valderrama y Norte, en producciones comerciales exclusivas para la elaboración de vinos (Almanza *et al.*, 2012).

En la actualidad, uno de los factores limitantes en la producción de uva, es el picudo *C. viridivittatus* (Coleóptera: Curculionidae), insecto de aparición reciente en el cultivo de vid en Boyacá, el cual según observaciones en campo, causa defoliación con la consecuente pérdida de vigor de las plantas y reducción de la producción de uva y deterioro de su calidad.

El potencial reproductivo de este insecto es alto; la hembra puede colocar posturas compuestas desde 53 a 94 huevos cada una, con más de 3.500 huevos ovipositados durante su etapa adulta. El ciclo de vida puede durar entre 134 a 268 d, con 1,36 a 2,72 generaciones por año, en las cuales el insecto adulto consume follaje, realizando cortes irregulares en los bordes de

las hojas y las larvas que son rizófagas, consumen la corteza de la raíz (Cano *et al.*, 2002).

En evaluaciones realizadas en cultivos de vid se ha determinado la presencia del picudo de los cítricos *C. viridivittatus* en poblaciones que sobrepasan el umbral de daño económico (Rincón *et al.*, 2015). Este es un insecto polífago, que se alimenta de una gran variedad de cítricos (lima rangpur, mandarina cleopatra, naranja valenciana, tangelo mineola, toronja), ciperáceas, mataratón, palma areca, mangostino, banano, guayaba, aguacate, mango, plátano, yuca, guácimo, bejuco trifoliado, fríjol, café, algodón, maní, sorgo, maracuyá, entre otros (Peñaloza y Diaz, 2004).

El control biológico busca disminuir la población de organismos plaga, ya sea de forma temporal o permanente (Van Driesche *et al.*, 2007) empleando diversos agentes como entomófagos (parasitoides y depredadores) o entomopatógenos. Hasta ahora, no se reporta la implementación de enemigos naturales para *C. viridivittatus* en vid como estrategia generalizada, sin

embargo, en algunas zonas productoras de cítricos en Colombia se han documentado parasitoides como *Aprostocerus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae) y *Trigonospila* sp. (Diptera: Tachinidae) y se ha evaluado el parasitoides *Fidiobia* sp. (Hymenoptera: Platygasteridae) en campo, este último, exhibiendo promedios de parasitismo cercanos al 50% en huevos de *Compsus* sp. (Estrada y Soto, 2011). En entomopatógenos, se observó en laboratorio el efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre adultos del picudo, encontrándose algunos aislamientos promisorios (Marín y Bustillo, 2008; Rincón y Montoya, 2015) y aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y nematodos *Steinernema* sp. y *Heterorhabditis* sp., obtenidos de suelos citrícolas, causaron mortalidades en adultos de *C. viridivittatus* entre el 94 y 100% para los hongos y 42 y 65% para los nematodos (Zuluaga *et al.*, 2015). Se evidencia así, que el control biológico de *C. viridivittatus* puede ser una alternativa viable dentro de programas de manejo integrado de plagas en cultivos de uva.

Los parasitoides del género *Trichogramma*, tienen gran importancia, por incluir especies de interés en el control biológico de plagas y por su facilidad para reproducirse masivamente en laboratorio (Navarro, 1990; Oliveira *et al.* 2000); dentro de las especies más importantes para el control de plagas se encuentran *Trichogramma pretiosum* Riley y *Trichogramma exiguum* (García *et al.*, 2011) como parasitoides de huevos de lepidópteros. En Coleóptera son escasos los reportes de parasitoidismo de huevos por especies de *Trichogramma*; sin embargo, existen estudios de *Ceratogramma etienney* en huevos de *Diaprepes abbreviatus* (coleoptera: curculionidae) (Amalin *et al.*, 2005), *Haeckeliana sperata* igualmente en huevos de *D. abbreviatus* (Carrillo *et al.*, 2008) y *Uscana lariophaga* en huevos de *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) y *Bruchidius atrolineatus* Pic, (Coleoptera: Bruchidae) (Van Huis *et al.*, 1991). En el caso específico del género *Compsus*, Estrada y Soto (2011) mencionan el parasitismo de *Haeckeliana* sp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae).

En cuanto a otro tipo de entomófagos, los hábitos depredadores son característicos del orden Neuróptera, entre los cuales se destaca *Chrysoperla carnea* (Stephens), por ser un buen controlador natural debido a su distribución geográfica, su tolerancia a insecticidas como abamectinas (Cerna *et al.*, 2012), alta voracidad, capacidad de búsqueda y facilidad de producción en laboratorio (Nasreen *et al.*, 2005). *C. carnea* es depredador de una amplia gama de artrópodos de cuerpo blando (áfidos, escamas, thrips, ácaros,

etc) y estados inmaduros como huevos y larvas (Yadav y Pathak, 2010), sin embargo, no se han reportado como depredadores de *C. viridivittatus*, desconociéndose el potencial controlador que este grupo pudiera tener sobre el picudo. Los depredadores de *Compsus* sp. reportados en campo incluyen a varias especies del orden Hymenoptera, familia Formicidae, como *Brachymyrme* sp., *Pheidole* sp., *Solenopsis* sp. y *Camponotus* sp. (Estrada y Soto, 2011).

Dada la importancia económica del cultivo de vid en algunas zonas de Boyacá, y el impacto nocivo que actualmente *C. viridivittatus* está ocasionando en el mismo, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto depredador de *C. carnea* y el efecto parasítico de *T. pretiosum* y *T. exiguum* sobre huevos de *C. viridivittatus* en condiciones de laboratorio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó a partir de la colecta de individuos adultos de *C. viridivittatus*, en un viñedo ubicado en el Valle de Sáchica (Boyacá) (5°36'3,23" N y 73°33'11,84" W). Este municipio tiene una extensión de 62,4 km<sup>2</sup>, temperatura promedio de 16,2°C y una altitud de 2.150 m. El material de vid presente corresponde a la cepa Cabernet Sauvignon, proveniente en su mayor parte de Francia, y con una extensión de 6 ha. Los individuos del picudo colectados fueron trasladados posteriormente al Laboratorio de Control Biológico (18±2°C y 60±5% HR) de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, en la ciudad de Tunja en donde se desarrollaron las pruebas biológicas (Fig. 1A).

La corroboración taxonómica de la especie *C. viridivittatus* (Guérin-Ménéville) se realizó empleando la clave desarrollada por O'Brien y Peña (2012), para adultos de *Compsus* Schoenherr (Coleoptera: Curculionidae: Entiminae) colectados en Colombia. Se identificaron los caracteres morfológicos específicos de *C. viridivittatus* descritos en la clave, como la extensión de una franja triangular desde el protórax hasta la base de la cabeza y la extensión de las cuatro franjas longitudinales de coloración verde con escamas metálicas sobre los élitros, entre otros.

Los parasitoides *T. exiguum* y *T. pretiosum* fueron suministrados por la empresa Bioagro Cartago SAS (Cartago, Valle del Cauca, Colombia) y el depredador *Chrysoperla carnea* por la empresa Perkins Ltda. (Palмира, Valle del Cauca, Colombia).



**Figura 1. Individuos de *C. viridivittatus*, confinados en condiciones de laboratorio. A. Macho y hembra; B. Montaje de recipientes para colecta de huevos.**

Los huevos de *C. viridivittatus* se obtuvieron de los adultos colectados en campo y mantenidos en el laboratorio. Para tal fin, se ubicaron machos y hembras en proporción 1:5, en recipientes de polietileno transparentes, de aproximadamente 2 kg de capacidad. Cada recipiente contenía hojas de vid como sustrato alimenticio y dos tiras dobles de plástico de 4 cm de ancho y 20 cm de largo, de color blanco, para proveer un sitio de oviposición, adaptando la metodología propuesta por Estrada y Soto (2011) (Fig. 1B).

Diariamente se revisaron las tiras plásticas y las hojas de vid, con el objeto de retirar los huevos que serían empleados posteriormente en las pruebas de parasitismo y depredación.

### Potencial parasítico de *T. pretiosum* y *T. exiguum* en huevos de *C. viridivittatus*

En la evaluación de los parasitoides se emplearon grupos de 240 huevos de *C. viridivittatus*, presentes en las tiras de plástico blanco antes mencionadas, evitando su manipulación, para no afectar su desarrollo normal. La unidad experimental consistió en envases de plástico transparentes, con una capacidad de 32 onzas, con ventilación, pero cierre hermético, en donde se ubicaron los huevos. En cada envase se introdujeron posteriormente los individuos del parasitoide a evaluar (*T. pretiosum* o *T. exiguum*) empleando

la presentación comercial de los mismos y ajustada según lo requerido. Los seis tratamientos evaluados se describen en la tabla 1A.

**Tabla 1. Tratamientos experimentales empleados en laboratorio en las pruebas de parasitismo (A) y depredación con huevos (B) de *C. viridivittatus*.**

A			
Ensayo	Tratamiento	Especie de parasitoide	Parasitoides/unidad experimental
1	T1	<i>T. pretiosum</i>	15
	T2	<i>T. pretiosum</i>	30
	T3	<i>T. pretiosum</i>	45
2	T1	<i>T. exiguum</i>	15
	T2	<i>T. exiguum</i>	30
	T3	<i>T. exiguum</i>	45
	Testigo	-	0
B			
Ensayo	Tratamiento	Larvas de depredador/recipiente	Huevos/unidad experimental
3	T1	1	80
	T2	1	160
	T3	1	240
	Testigo	0	240



Transcurridas 72 h se retiraron los parasitoides del recipiente y se continuó con el seguimiento al desarrollo de los huevos del picudo. Las variables evaluadas diariamente fueron: número de larvas de *C. viridivittatus* emergidas, número de huevos parasitados y número de individuos emergidos de cada especie de parasitoide evaluado. Las larvas y parasitoides emergidos se separaron diariamente del recipiente después del conteo.

Los ensayos con cada especie de parasitoides se establecieron con un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA), con tres repeticiones y un testigo absoluto sin presencia de parasitoides.

### Efecto depredador de *Chrysoperla carnea* sobre huevos de *C. viridivittatus*

En la evaluación de *C. carnea* se empleó la misma metodología que en el ensayo anterior y el mismo tipo de unidad experimental. En cada recipiente plástico se ubicaron los huevos de *C. viridivittatus* (Tab. 1B) y se introdujo posteriormente una larva de segundo instar del depredador *C. carnea*, excepto en el testigo.

Las unidades experimentales se observaron diariamente, por un periodo de 15 d, tiempo de duración máxima del estado de huevo de *C. viridivittatus*, antes de su emergencia. Se tomaron datos como el número de larvas del picudo emergidas y el número de huevos consumidos por *C. carnea*.

El ensayo se estableció con diseño experimental completamente aleatorizado (DCA), con tres repeticiones

y un testigo absoluto sin depredador. En todos los ensayos se realizó análisis de varianza (ANOVA) y Prueba de Comparación de Medias de Tukey (95%) utilizando el programa estadístico SAS V. 8.1.

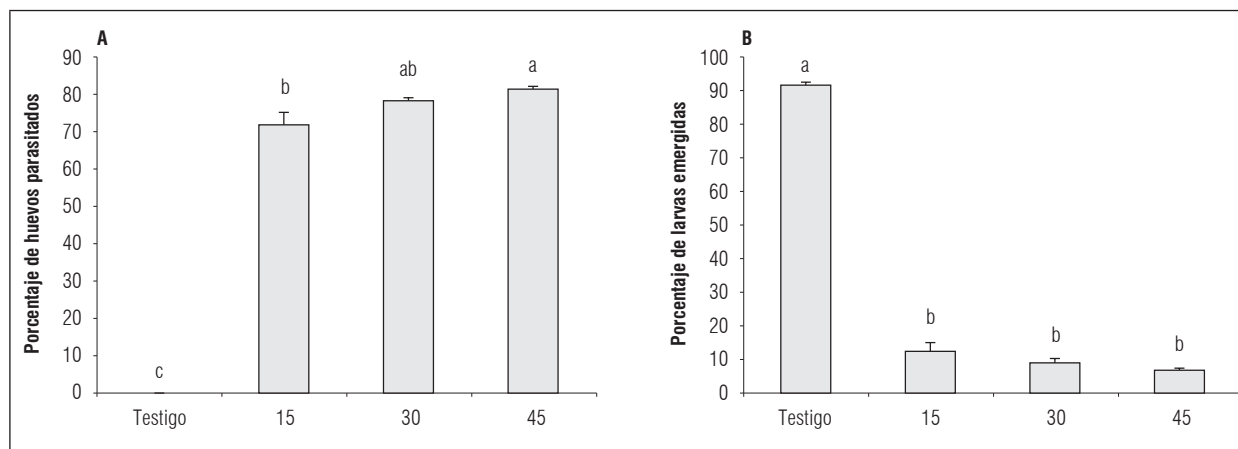
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Potencial parasítico de *Trichogramma pretiosum* en huevos de *C. viridivittatus*

En la evaluación del efecto parasítico de *T. pretiosum* sobre huevos de *C. viridivittatus* en condiciones de laboratorio, el análisis de varianza indicó diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre los tratamientos evaluados respecto del porcentaje de parasitismo.

La prueba de comparación de medias de Tukey corroboró dichas diferencias, siendo los tratamientos de 45 y 30 individuos de *T. pretiosum* los que brindaron mayor control sobre los huevos del picudo, con porcentajes de parasitismo de 82,5 y 79,3% (Fig. 2A). Aunque la densidad de 15 individuos presentó el menor control entre los tres tratamientos evaluados, el porcentaje de parasitismo de 72,7% se considera un valor importante. En el tratamiento control los huevos se desarrollaron de manera normal, permitiendo una emergencia casi completa de las larvas de *C. viridivittatus* (92,08%).

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Basso *et al.* (1999), quienes en Uruguay, en plantas de vid, evidenciaron un porcentaje de parasitismo producido por adultos de *T. pretiosum* sobre *Bonagota*



**Figura 2. A. Parasitismo y B. Emergencia de larvas en huevos de *C. viridivittatus*, expuestos a tres densidades de *Trichogramma pretiosum* en laboratorio. Promedios con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).**



*cranaodes* (Lepidoptera: Tortricidae) del 82,5%, igual al que se obtuvo en el presente estudio con 45 parasitoides, pero sobre un coleóptero. Por otro lado, Estrada y Soto (2011) con *Fidiobia* sp. (Hymenoptera: Platygasteridae) obtuvieron un parasitismo menor (55%) al de este estudio, sobre huevos de *Compsus* sp. en cultivos de cítricos, cuando se liberaron 500 adultos del parasitoide. Lo anterior puede indicar que aunque *T. pretiosum* se recomienda generalmente para el manejo de lepidópteros, es potencialmente útil para el control de *C. viridivittatus* en vid, toda vez que los huevos son colocados en las hojas.

Respecto al porcentaje de emergencia de larvas de *C. viridivittatus* y acorde con los resultados anteriores, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo ( $P \leq 0,05$ ), obteniéndose valores de emergencia de 12,5; 9,0 y 6,8%, para 45, 30 y 15 individuos de *T. pretiosum*, respectivamente, lo cual indica que cualquiera de las densidades de parasitoides utilizadas, pueden generar una alta mortalidad de huevos de esta plaga (Fig. 2B, Fig. 5A).

### Potencial parasítico de *Trichogramma exiguum* en huevos de *C. viridivittatus*

En la evaluación del efecto parasítico de *T. exiguum* sobre huevos de *C. viridivittatus* en condiciones de laboratorio, el análisis de varianza indicó diferencias significativas entre los tratamientos ( $P \leq 0,05$ ), se identificaron tres grupos estadísticamente diferentes (Fig. 3A), siendo el porcentaje de parasitismo, mayor en el tratamiento de 45 parasitoides, con un 69,4%,

seguido por 30 y 15 parasitoides con 50,9 y 17,9%, respectivamente.

De acuerdo con lo reportado por Estrada y Soto (2011) para *Fidiobia* sp. (Hymenoptera: Platygasteridae), que presentó un parasitismo de 55% sobre huevos de *Compsus* sp. en cultivos de cítricos con 500 adultos del parasitoide, se observa que el valor obtenido en el presente estudio es mayor, en virtud a que empleando menos individuos (45) de *T. exiguum* se logró cerca del 70% de parasitismo. Se debe considerar sin embargo, que las condiciones en el presente trabajo fueron controladas en laboratorio, mientras que en el estudio con *Fidiobia* sp. se realizó con árboles confinados en jaulas en campo.

En *T. exiguum* se han reportado valores de parasitismo de 80 y 65% sobre huevos de los tortricidos *Argyrotaenia* sp. y *Gymnandrosoma aurantianum*, respectivamente (Basso *et al.*, 1999), afectando vid en Uruguay; estos difieren en buena parte con los valores aquí obtenidos, posiblemente por las características de especificidad, adaptabilidad biológica y fisiológica de los parasitoides hacia sus hospederos (Madrigal, 2001).

En cuanto a la variable, emergencia de larvas de *C. viridivittatus*, se pudo evidenciar que hubo diferencias significativas entre los tratamientos ( $P \leq 0,05$ ) estableciendo tres grupos distintos con porcentajes de 74,0; 50,1 y 18,8%, de emergencia para 15, 30 y 45 parasitoides, respectivamente; el tratamiento de 45 parasitoides generó entonces el mayor porcentaje de parasitismo sobre los huevos de *C. viridivittatus*, afectando la emergencia de larvas del picudo (Fig. 3B, Fig. 5B).

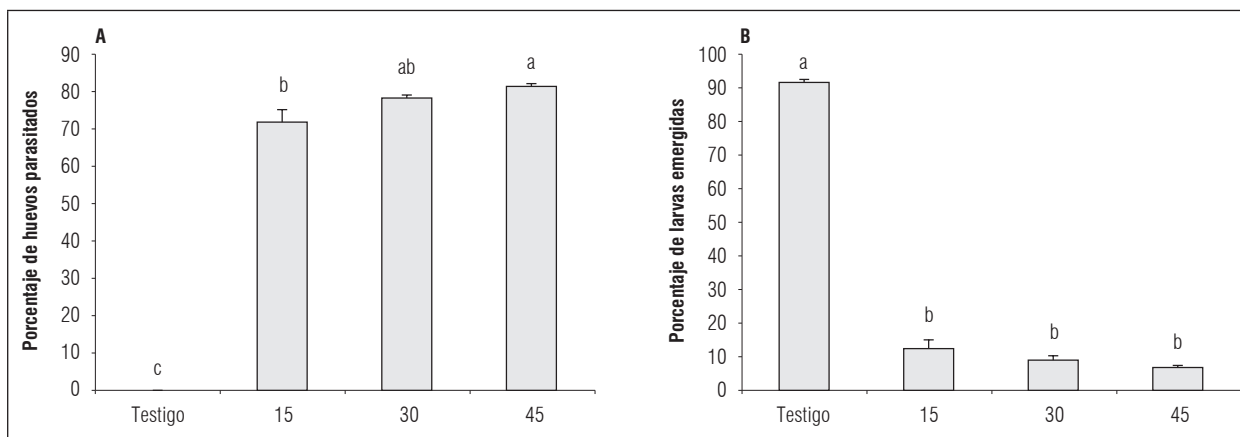
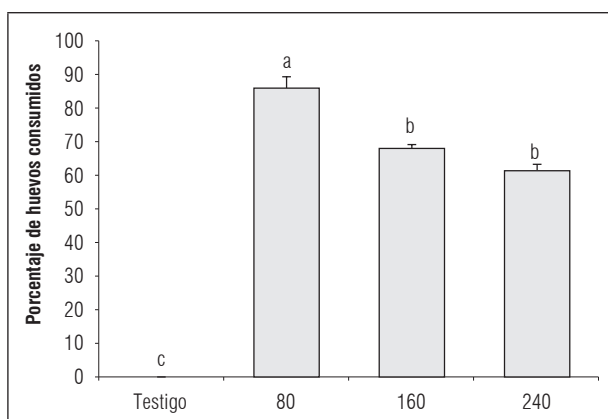


Figura 3. A. Parasitismo y B. Emergencia de larvas en huevos de *C. viridivittatus*, expuestos a tres densidades de *Trichogramma exiguum* en laboratorio. Promedios con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Lo anterior indicaría que se puede lograr un alto porcentaje de parasitismo de *Trichogramma exiguum* sobre huevos de *C. viridivittatus*, pero empleando densidades altas o proporciones mayores a 1:5 (huésped: parasitoide), lo cual indicaría que una estrategia inundativa sería más aconsejable con este parasitoide.

Las variaciones en el porcentaje de parasitismo pueden deberse a varios factores como calidad del hospedero, hábitat, condiciones climáticas, especie de parasitoide (Zago *et al.*, 2007) y cada especie de *Trichogramma* spp. presenta características distintas en cuanto a capacidad de dispersión y parasitismo del hospedero (Pinto *et al.*, 2003).



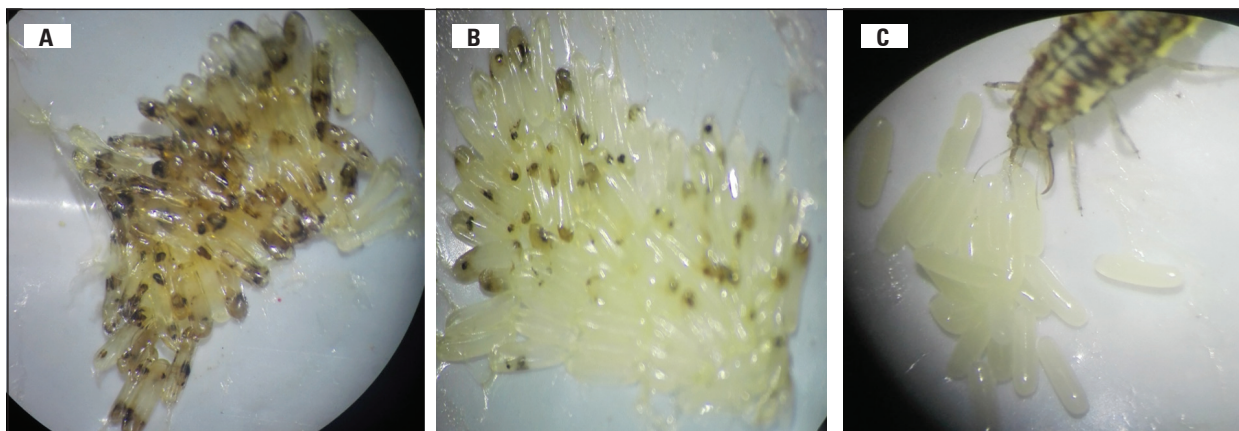
**Figura 4.** Depredación de huevos de *C. viridivittatus*, por larvas de *Chrysoperla carnea* sometidas a tres densidades de presa. Promedios con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

En el presente trabajo, la variable emergencia de parasitoides no se pudo cuantificar, en virtud a que luego de ser parasitados los huevos, trascurrieron varios días, observándose cambios en la coloración, pero en ningún momento hubo emergencia de parasitoides; cabe resaltar que los parasitoides con los cuales se realizó la investigación, son multiplicados comercialmente en huevos del lepidóptero *Sitotroga cerealella* y además las condiciones medio ambientales variaron desde el sitio de producción (Palmira, Valle del Cauca) al sitio del ensayo, lo cual pudo influir en la viabilidad del parasitoide, evitando que cumpla todo su ciclo de vida dentro de los huevos de *C. viridivittatus*.

Así mismo, diferencias debidas a características intrínsecas del hospedero como ancho del corion, área superficial del huevo (Smith, 1994), calidad nutricional del huevo, presencia de volátiles (Prattisoli *et al.*, 2004) y a la misma cantidad de huevos expuestos (Polanczyk *et al.*, 2011), pudieron alterar el nivel de parasitismo y el normal desarrollo de los parasitoides evaluados.

#### Efecto depredador de *Chrysoperla carnea* en huevos de *C. viridivittatus*

En la evaluación del efecto depredador de *Chrysoperla carnea* sobre huevos de *C. viridivittatus*, en laboratorio, no se presentaron diferencias significativas entre las densidades de presa de 160 y 240 huevos, pero si con respecto a la de 80 huevos ( $P \leq 0,05$ ). En la prueba de Tukey se estableció que hay dos grupos estadísticamente diferentes, en relación con el porcentaje de



**Figura 5.** Huevos de *C. viridivittatus*, parasitados por A. *T. pretiosum*; B. *T. exiguum* y C. Consumidos por *C. carnea*, en condiciones de laboratorio.

huevos consumidos; el mayor consumo se observó en la densidad de presa de 80 huevos con un 85,8%. En las densidades de 160 y 240 huevos, el porcentaje de huevos consumidos fue menor, pero siempre se ubicó por encima del 50% (67,9 y 61,2%, respectivamente) (Fig. 4), lo cual indicaría un nivel de consumo potencialmente útil para afectar la población de *C. viridivittatus* en condiciones de campo.

En la densidad de presa de 80 huevos, como se mencionó, *C. carnea* ejerció una depredación superior al 80%; estos resultados son similares a los reportados por Castro *et al.* (2016) en donde se observó un consumo del 80% de ninfas de *T. vaporariorum* por *C. externa*, con una densidad de presa de 75 individuos. Se resalta que en ambos estudios las condiciones de temperatura y humedad relativa fueron similares, en virtud que se realizó en el mismo laboratorio, aunque con diferente presa.

Según se observa en la figura 4, se evidenció una menor capacidad de consumo de *C. carnea* a mayor densidad de huevos de *C. viridivittatus*, caso contrario a lo reportando por Hassanpour *et al.* (2015) quienes obtuvieron un consumo promedio por parte de *C. carnea*, de 150 individuos, a pesar de emplear diferentes densidades de presa, aunque con individuos de *Aphis fabae*.

Los anteriores resultados demuestran que probablemente una densidad de presas de 80 huevos de *C. viridivittatus*, es suficiente alimento para el depredador, como lo sugieren autores como Barbosa *et al.* (2008), quienes mencionan que una vez se consumen la cantidad de presas necesarias para su desarrollo, las larvas de *C. externa* reducen su nivel de consumo, evidenciando una respuesta de tipo funcional.

Estudios específicos de depredación de estados inmaduros de Coleópteros como huevos o larvas por *Chrysoperla* spp. no son muy evidentes en la literatura científica, aunque se mencionan algunos usos en control de Crysomelidos como *Leptinotarsa decemlineata* en cultivos de berenjenas. Estas aplicaciones se basan en las características principales de este grupo de depredadores como su amplio rango de presas, considerándolas de hábitos polífagos, especialmente las larvas de uso comercial y su eficiencia en la depredación, toda vez que las larvas consumen una gran cantidad de alimento para completar su desarrollo (Pappas *et al.*, 2011).

No obstante, las observaciones realizadas, se debe complementar los estudios de consumo de huevos de

*C. viridivittatus* por *C. carnea*, para concluir al respecto, toda vez que el área experimental que se implemente, especialmente si es a pequeña escala, puede afectar el nivel de consumo, en virtud que el depredador encuentra a su presa con mayor rapidez (Montserrat *et al.* 2000), como se observó en el presente estudio (Fig. 5C). Por lo anterior, sería conveniente desarrollar estos estudios sobre plantas en confinamiento para establecer la capacidad de búsqueda de los huevos de *C. viridivittatus* por *C. externa* en condiciones menos controladas.

## CONCLUSIONES

El porcentaje de parasitismo sobre huevos de *Compsus viridivittatus*, con densidades desde 15 individuos de *Trichogramma pretiosum* fue superior al 70%; mientras tanto, en el caso de *Trichogramma exiguum*, densidades inferiores a 45 individuos no representaron un efecto negativo significativo sobre la emergencia de las larvas de *C. viridivittatus*.

*Chrysoperla carnea* ejerció una acción depredadora superior al 80% sobre huevos de *C. viridivittatus*, cuando existe una proporción 1: 80 (depredador: presa).

*Trichogramma pretiosum* y *Chrysoperla carnea* pueden ser consideradas herramientas potenciales de control biológico de *C. viridivittatus*, en el cultivo de vid en Boyacá, aunque se requieren pruebas de campo para su validación.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Investigaciones DIN, Grupo Manejo Biológico de Cultivos de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia y Viñedo Umaña Dajud, por la financiación del proyecto SGI 1913.

**Conflicto de intereses:** el manuscrito fue preparado y revisado con la participación de los autores, quienes declaran no tener algún conflicto de interés que coloquen en riesgo la validez de los resultados aquí presentados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Almanza, P., G. Fischer, A. Herrera, A. Jarma y H. Balaguera. 2012. Physicochemical behavior of 'Riesling × Silvaner' grapevine fruit under the high-altitude conditions

- of Colombia (South America). *J. Appl. Bot. Food Qual.* 85(1), 49-54. Doi: 10.17584/rcch.2012v6i1.1283
- Amalin, D.M., J.E. Peña y R.E. Duncan. 2005. Effects of host age, female parasitoid age, and host plant on parasitism of *Ceratogramma etiennei* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Fla. Entomol.* 88(1), 77-82. Doi: 10.1653/0015-4040(2005)088[0077:EOHAFP]2.0.CO;2
- Barbosa, L., C. Carvalho, B. Souza y A. Auad. 2008. Eficiência de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuróptera: Chrysopidae) no controle de *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) em pimentão (*Capsicum annum* L.). *Ciênc. Agrotec.* 32(4), 1113-1119. Doi: 10.1590/S1413-70542008000400012
- Basso, C., G. Grille y B. Pintureau. 1999. Eficacia de *T. exiguum* y *T. pretiosum* en el control de *Argyrotaenia sphaleropa* y *Bonagota cranaodes* en la vid en Uruguay. *Agrociencia* 3(1), 20-26.
- Cano, D., P. Bustillo, R. Cárdenas y L. Orozco. 2002. Biología y enemigos nativos del picudo de los cítricos *Compsus* n. sp. (Coleoptera: Curculionidae). *Rev. Colomb. Entomol.* 28(1), 34-41.
- Carrillo, D., J.E. Peña y J.L. Capinera. 2008. Effect of host plants on successful parasitism by *Haeckelia nia sperata* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) on *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) eggs. *Environ. Entomol.* 37(6), 1565-1572. Doi: 10.1603/0046-225X-37.6.1565
- Castro, M., J.W. Martínez y M. Dotor. 2016. Evaluación del efecto regulador de *Chrysoperla externa* sobre mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* en tomate. *Rev. Cienc. Agr.* 33(2), 43-54. Doi: 10.22267/rcia.163302.51
- Cerna, A., J. Landeros, S. Sánchez, M. Badii, L. Aguirre e Y. Ochoa. 2012. Comparación de la toxicidad y selectividad de insecticidas para la plaga *Bactericera cockerelli* y su depredador *Chrysoperla carnea*. *Agrociencia* 46, 783-793.
- Estrada, G. y A. Soto. 2011. Parasitismo de *Fidiobia* sp. (Himenóptera: Platygasteridae) sobre *Compsus* sp. (Coleóptera: Curculionidae). *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. Univ. Caldas* 15(2), 201-205.
- García, F., R. Mercado, A. González y M. Ramírez. 2011. Especies nativas de *Trichogramma* (Hymenoptera: trichogrammatidae) colectadas en cultivos agrícolas del norte de México. *Rev. Chapingo Ser. Cienc. For. Ambient.* 17(ed. esp.), 173-181. Doi: 10.5154/rchscfa.2010.09.070
- Hassanpour, M., R. Maghami, H. Rafiee-Dastjerdi, A. Golizadeh, M. Yazdanián y A. Enkegaard. 2015. Predation activity of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) upon *Aphis fabae* (Hemiptera: Aphididae): effect of different hunger levels. *J. Asia Pac. Entomol.* 18, 297-302. Doi: 10.1016/j.aspen.2015.03.005
- Madrigal, A. 2001. Generalidades sobre himenóptera parasitoides. pp. 83-120. En: *Fundamentos de control biológico de plagas*. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Marín, P. y A. Bustillo. 2008. Selección de aislamientos de *Beauveria bassiana* virulentos a *Compsus* n.sp. *Cenicafe* 59(2), 165-173.
- Montserrat, M., R. Albajes y C. Castane. 2000. Functional response of four heteropteran predators preying on greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) and Western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae). *Environ. Entomol.* 29, 1075-1082. Doi: 10.1603/0046-225X-29.5.1075
- Nasreen, A., G. Mustafa y M. Ashfaq. 2005. Mortality of *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) after exposure to some insecticides; laboratory studies. *S. Pac. Stud.* 26(1), 1-6.
- Navarro, M.A. 1990. Producción, uso y manejo en Colombia: el *Trichogramma* spp. ICA, Palmira, Colombia.
- O'Brien, C.W. y J. Peña. 2012. Two species of *Compsus* Schoenherr, new citrus pest from Colombia (Coleoptera: Curculionidae: Entiminae). *Insecta Mundi* 0227, 1-13.
- Oliveira, H., J. Zanuncio, D. Pratisoli e I. Cruz. 2000. Parasitism rate and viability of *Trichogramma maxacalii* (Hym.: Trichogrammatidae) parasitoid of the eucalyptus defoliator *Euselasia apisaon* (Lep.: Riodinidae), on eggs of *Anagasta kuehniella* (Lep.: Pyralidae). *For. Ecol. Manage.* 130, 1-6. Doi: 10.1016/S0378-1127(99)00172-3
- Pappas, M.L., G.D. Broufas y D.S. Koveos. 2011. Chrysopid predators and their role in biological control. *J. Entomol.* 8(3), 301-323. Doi: 10.3923/je.2011.301.326
- Peñaloza, C. y R. Diaz. 2004. Así se maneja y controla el picudo de los cítricos *Compsus* sp. ICA, Bogotá, Colombia.
- Pinto, A., J. Parra, H. Oliveira y E. Arrigoni. 2003. Comparação de técnicas de liberação de *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae). *Neotrop. Entomol.* 32, 311-318. Doi: 10.1590/S1519-566X2003000200018
- Polaczyk, R., W. Barbosa, F. Celestino, D. Pratisoli, A. Holtz, A. Milanez, J. Cochetto y A. Silva. 2011. Influência da densidade de ovos de *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera: Crambidae) na capacidade de parasitismo de *Trichogramma exiguum* Pinto & Platner e *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Neotrop. Entomol.* 40(2), 238-243. Doi: 10.1590/S1519-566X2011000200013
- Pratisoli, D., A. Holtz, J. Gonçalves y R. De Oliveira. 2004. Características biológicas de linhagens de *Trichogramma pretiosum*, criados em ovos de *Sitotroga cerealella* e *Anagasta kuehniella*. *Hortic. Bras.* 22, 562-565. Doi: 10.1590/S0102-05362004000300012
- Rincón, E. y C. Montoya. 2015. Evaluación de la eficacia de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* en el control de picudos asociados con la vid, utilizando activadores de patogenicidad. *Novedades Técnicas* 24, 5-12.



- Smith, S. 1994. Methods and timing of releases of *Trichogramma* to control lepidopterous pests. p. 113-144. En: Wajnberg, E. y S.A. Hassan (eds.). Biological control with egg parasitoids. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Van Driesche, R., M. Hoddle y T. Center. 2007. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. U.S. Department of Agriculture (USDA), Washington DC, USA.
- Van Huis, A., M.G. Wijkamp, P.M. Lammers, C.G.M. Klein Goldewijk, J.H. van Seeters y N.K. Kaashoek. 1991. *Uscana lariophaga* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), an egg parasitoid of bruchid beetle (Coleoptera: Bruchidae) storage pests in West Africa: host-age and host-species selection Bull. Entomol. Res. 81(1), 65-76. Doi: 10.1017/S0007485300053256
- Yadav, R. y P. Pathak. 2010. Effect of temperature on the consumption capacity of *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) reared on four aphid species. Bioescan 5(2), 271-274.
- Zago, H., D. Pratisoli, R. Barros, J. Gondim y J. Dos Santos. 2007. Capacidade de parasitismo de *Trichogramma pratissolii* Querino & Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em hospedeiros alternativos, sob diferentes temperaturas. Neotrop. Entomol. 36(1), 84-89. Doi: 10.1590/S1519-566X2007000100010
- Zuluaga, P.A., A.M. Caicedo, N. Cardozo, J.E. Muñoz y A. Carabalí. 2015. Entomopatogenos asociados a cítricos y su patogenicidad sobre *Compus viridivittatus* Guérin-Ménéville (Coleoptera: Curculionidae: Entiminae). Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu. 16(2), 293-305. Doi: 10.21930/rcta.vol16\_num2\_art:374



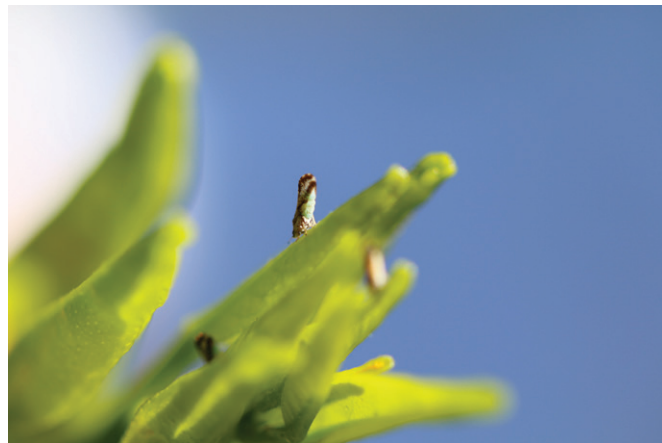
# Evaluation of the efficacy of neonicotinoid and pyrethroid insecticides in *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) populations in Colombia

## Evaluación de la eficacia de insecticidas neonicotinoides y piretroides sobre poblaciones de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) en Colombia

AUGUSTO RAMÍREZ-GODOY<sup>1</sup>  
GINA PUENTES-PÉREZ<sup>1</sup>  
HERMANN RESTREPO-DÍAZ<sup>1, 2</sup>

*Diaphorina citri* in 'Tahiti' lime.

Photo: A. Ramírez-Godoy



### ABSTRACT

The Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* is the insect vector of the disease known as huanglongbing (HLB), which is the most devastating disease of citrus crops in the world. The Asian citrus psyllid was officially reported in Colombia in 2007, and a national phytosanitary emergency was declared because of the presence of HLB in 2015. Two different experiments were carried out in two locations (Apulo and Jerusalén, Department of Cundinamarca) in Colombia to evaluate the effectiveness of neonicotinoid (clothianidin, imidacloprid and thiamethoxan) and pyrethroid applications (bifenthrin, deltamethrin and lambda cyhalothrin) on the control of *D. citri* populations (adults, nymphs and eggs) in 'Tahiti' lime trees established under tropical dry forest conditions. In the first experiment, trees were foliarly treated as follows: (1) untreated trees; (2) trees treated with 100 g ha<sup>-1</sup> of imidacloprid; (3) trees treated with 60 g ha<sup>-1</sup> of bifenthrin; (4) trees treated with 12.5 g ha<sup>-1</sup> of deltamethrin and (5) trees treated with a co-formulation of 70 g ha<sup>-1</sup> of a neonicotinoid (thiametoxan) and 53 g ha<sup>-1</sup> of a pyrethroid (lambda cyhalothrin). In the second experiment, trees were treated with 100 g ha<sup>-1</sup> of clothianidin. Foliar insecticide applications were carried out at 0 and 4 weeks after the initiation of treatments (WAT). In the first trial, the control presented a mean number of individuals per flush of  $\approx 1.14$ , whereas the trees treated with neoinicotinoids and pyrethroids showed 50% fewer individuals (0.53-0.61). For the population of immatures, the number of nymphs was 2.25 nymphs per flush in the control, as compared to 0.82-1.22 individuals observed in the treatments with insecticides. The mean number of eggs was

<sup>1</sup> Faculty of Agricultural Sciences, Department of Agronomy, Universidad Nacional de Colombia, Bogota (Colombia).  
ORCID Ramírez-Godoy, A.: 0000-0003-4347-8170; ORCID Puentes-Pérez, G.: 0000-0003-1839-4960; ORCID Restrepo-Díaz, H.: 0000-0002-1838-5872

<sup>2</sup> Corresponding author. [hrestrepod@unal.edu.co](mailto:hrestrepod@unal.edu.co)

also between 80-100% higher in the control trees (2.37 individuals), as compared to the treated trees (1.14-1.78). In the second trial, the use of clothianidin showed a higher control of eggs. The results suggest that the rotation of neonicotinoids with pyrethroids can be a tool to reduce populations and delay resistance processes in *D. citri* in citrus trees established under tropical dry forest conditions in Colombia.

**Additional key words:** Asian Citrus Psyllid, greening, insecticide resistance, insecticide rotation, percentage of efficacy.

## RESUMEN

El psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* es el insecto vector de la enfermedad conocida como huanglongbing (HLB), la cual es la enfermedad más devastadora de estos cultivos en el mundo. El psílido asiático de los cítricos fue reportado oficialmente en Colombia en 2007 y se declaró la emergencia nacional fitosanitaria por HLB en 2015. Con el objetivo de estudiar estrategias de manejo del insecto vector, se llevaron a cabo dos experimentos diferentes en dos localidades (Apulo y Jerusalén, Departamento de Cundinamarca) en Colombia, en los que la efectividad de aplicaciones de neonicotinoides (clothianidin, imidacloprid y thiametoxan) y piretroides (bifentrina, deltametrina y lambdacialotrina) fue evaluada sobre poblaciones de *D. citri* (adultos, ninfas y huevos) en árboles de lima 'Tahití' establecidos en condiciones de bosque seco tropical. En el primer experimento, los árboles fueron tratados foliarmente de la siguiente manera: (1) árboles sin tratar; (2) árboles tratados con imidacloprid a una dosis 100 g ha<sup>-1</sup> i.a.; (3) árboles tratados con bifentrina a una dosis de 60 g ha<sup>-1</sup> i.a.; (4) árboles tratados con deltametrina a 12,5 g ha<sup>-1</sup> i.a. y (5) una coformulación de thiametoxan y lambda-cyhalothrina a una dosis de 70 g ha<sup>-1</sup> i.a. El segundo experimento consistió en árboles tratados con clothianidin a 100 g ha<sup>-1</sup> i.a. Las aplicaciones foliares de los insecticidas fueron desarrolladas a las 0 y 4 semanas de iniciados los tratamientos (SIT). En el primer ensayo, el control presentó ≈1,14 individuos promedio por brote, mientras los árboles tratados con neonicotinoides y piretroides mostraron un 50% menos de individuos (0,53-0,61). Con respecto a la población de inmaduros, el número de ninfas promedio fue 2,25 ninfas por brote en el control comparado a los 0,82-1,22 individuos observados en los tratamientos con insecticidas. El número de huevos promedio también fue entre un 80-100% mayor en árboles control (2,37 individuos) en comparación a árboles tratados (1,14-1,78). Con respecto al segundo ensayo, el uso de clothianidin presentó un mayor control de huevos. Los resultados obtenidos permiten sugerir que la rotación de neonicotinoides con piretroides puede ser una herramienta para reducir las poblaciones del psílido asiático de los cítricos y retrasar procesos de resistencia del vector en cultivos de cítricos establecidos en condiciones de bosque seco tropical en Colombia.

**Palabras clave adicionales:** psílido asiático de los cítricos, greening, resistencia a insecticidas, rotación de insecticidas, porcentaje de eficacia.

Fecha de recepción: 14-03-2018 Aprobado para publicación: 30-05-2018

## INTRODUCTION

The Asian Citrus Psyllid (ACP) *Diaphorina citri* Kuwamura (Hemiptera: Liviidae) is the vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus*, which is the cause of the huanglongbing disease (HLB) (also known as citrus greening) (Cocco and Hoy, 2008). ACP is mainly associated with species of the Rutaceae family (especially limes and lemons) and feeds

directly on the phloem content of young flushes (Boina and Bloomquist, 2015).

ACP was officially reported in Colombia in 2007 (Santivañez *et al.*, 2013). However, the Colombian Agricultural Institute (ICA) declared a phytosanitary emergency because of the presence of *D. citri* adults

infected with the bacterium, which caused the HLB disease in 2015 (ICA, 2015; 2017). Consequently, citrus producers require the development of strategies for the management of the vector. In Colombia, pyrethroid and neonicotinoid insecticides may play an important role in Integrated Pest Management (IPM) programs (Sétamou *et al.*, 2010). However, in the management of ACP there are no records of its use.

Several active ingredients have been evaluated to control ACP adults and immatures (Tiwari *et al.*, 2011). Systemic insecticides from the group of neonicotinoids, such as clothianidin, imidacloprid and thiamethoxan, have been widely used in crop protection, showing positive results in the control of ACP populations (Elbert *et al.*, 2008; Sétamou *et al.*, 2010; Qureshi *et al.*, 2014). Imidacloprid is one of the molecules widely used in management programs (Ruiz-Galván *et al.*, 2015). Boita *et al.* (2015) stated that foliar applications of neonicotinoids provide the longest lasting protection (8-9 weeks), with imidacloprid having the highest adult control (50-90%). Hernández-Fuentes *et al.* (2012) showed that foliar applications of imidacloprid exerted more than 85% control of ACP nymphs for 27 d after application. On the other hand, thiamethoxan and clothianidin are second-generation neonicotinoids that are widely used in IPM programs (Maienfisch *et al.*, 2001). Qureshi *et al.* (2009) observed that thiamethoxan applications were more effective than imidacloprid in controlling ACP populations in sweet orange (*Citrus sinensis*). ACP has also shown susceptibility to the use of clothianidin. It has been reported that the  $LC_{50}$ , through ingestion of clothianidin and Imidacloprid, is 0.09 parts per million (ppm) and 0.11 ppm for thiamethoxan (Langdon and Rogers, 2017).

Insecticides of the pyrethroid group are currently the main kind of neurotoxic insecticide and are widely used in crop protection (Davies *et al.*, 2007). Applications of several groups of pyrethroids, such as fenpropathrin (Stansly *et al.*, 2015), cypermethrin (Boina and Bloomquist, 2015), lambda cyhalothrin (Yamamoto *et al.*, 2009) and bifenthrin (Pardo *et al.*, 2017), have been reported in ACP population control programs in several citrus species. In Colombia, there is great ecological diversity, which creates the need to design integrated management programs according to these varied conditions. To do so, it is necessary to study the control exerted by insecticides on *D. citri* populations in the different areas where this pest can develop (the insect can establish itself in both dry tropical forest areas and premontane wet and dry forests) (Ebratt-Ravelo *et al.*, 2011). Chemical control

has been a strategy that has shown positive results in the reduction of insect populations, and knowledge on the effectiveness of different active ingredients allows for rotation with the purpose of decreasing resistance within ACP populations (Sétamou *et al.*, 2010; Boina and Bloomquist, 2015; Ruiz-Galván *et al.*, 2015). The objective of the present study was to evaluate the effectiveness of foliar applications of neonicotinoids (clothianidin, imidacloprid and thiametoxan) and pyrethroids (bifenthrin and deltamethrin) on the control of ACP populations in 'Tahiti' lime orchards established in tropical dry forest conditions.

## MATERIAL AND METHODS

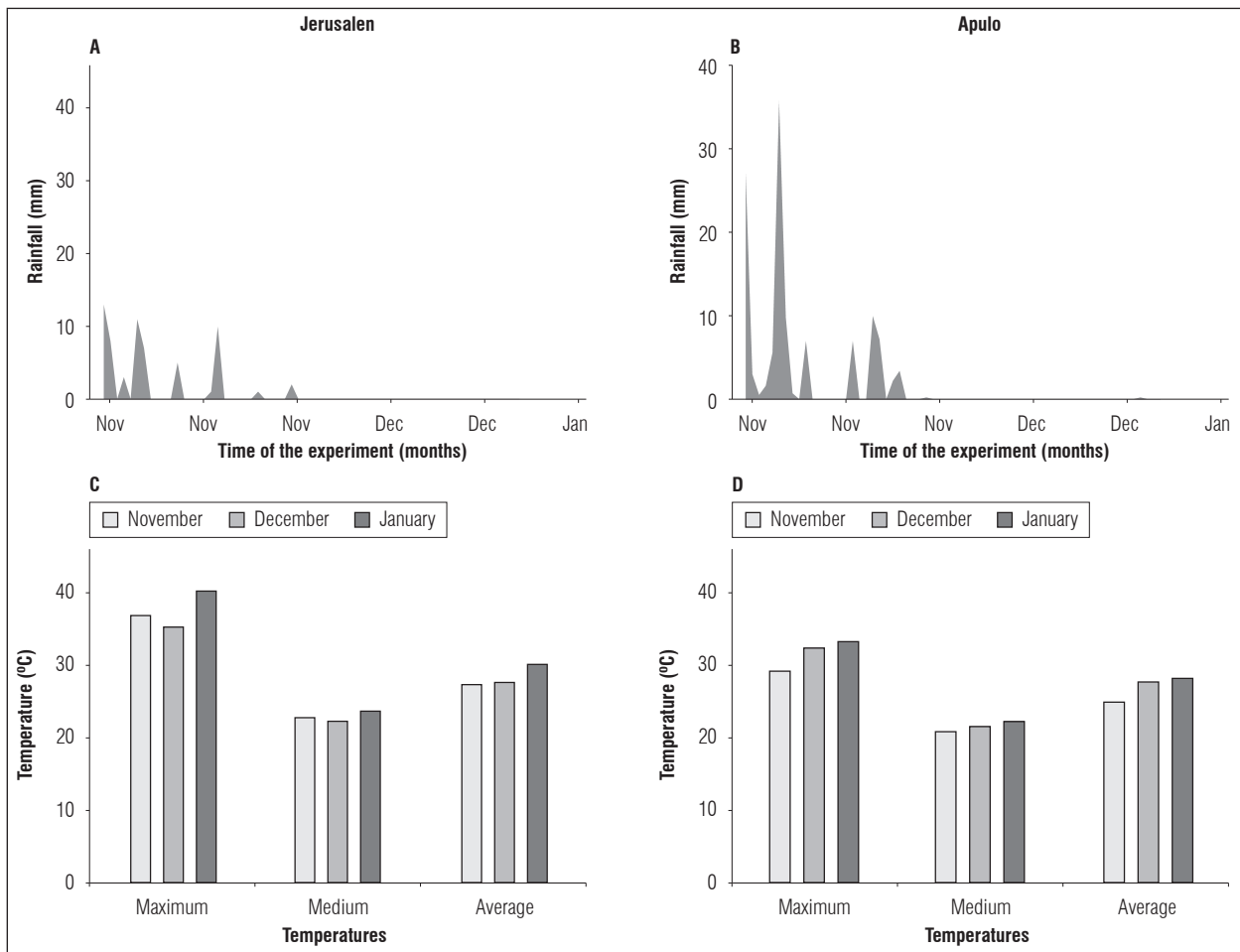
### Neonicotinoid and pyrethroid evaluation

Two trials were carried out separately between November 2015 and January 2016 on farms under drip irrigation conditions located in the municipalities of Apulo (4°30'44.73" N and 74°34'57.58" W, altitude: 420 m a.s.l.) and Jerusalén (4°33'33.91" N and 74°41'39.09" W, altitude: 316 m a.s.l.) in the Department of Cundinamarca in Colombia. The climatic conditions during the two trials are presented in figure 1. The studies were conducted on 8 and 6 years-old 'Tahiti lime' trees (*Citrus latifolia* Tanaka), grafted on 'Citrumelo CPB 4475' (*Poncirus trifoliata* × *Citrus Paradis*) in Apulo and Jerusalén, respectively.

The evaluated treatments were: (1) control (trees without foliar application of any pesticide); (2) trees treated with 100 g ha<sup>-1</sup> of a neonicotinoid insecticide, imidacloprid (Confidor® 350 SC; Bayer); (3) trees sprayed with 60 g ha<sup>-1</sup> of a pyrethroid insecticide, bifenthrin (Brigada® 100 EC; FMC); (4) a treatment with 12.5 g ha<sup>-1</sup> of a pyrethroid insecticide, deltamethrin (Dinastia® 100 EC; Bayer) and (5) a commercial insecticide co-formulation of 70 g ha<sup>-1</sup> of a neonicotinoid (thiametoxan) and 53 g ha<sup>-1</sup> of a pyrethroid (lambda cyhalothrin) (Engeo®; Syngenta).

### Clothianidin evaluation

Two experiments were also carried out between January and March 2016 on the "Tortugas" and "Parcela 3" farms located in the municipality of Jerusalén (4°33'33.91" N and 74°41'39.09" W, altitude: 316 m a.s.l.) in the Department of Cundinamarca in Colombia. The climatic conditions during the trials



**Figure 1.** Rainfall records, and maximum, minimum and average temperatures for neonicotinoid and pyrethroid evaluation trials in Jerusalem (A and C) and Apulo (B and D). Data were obtained from two nearby weather stations [Jerusalem (4°56'18".06" N and 74°70'23.99", altitude: 297 m a.s.l.) and Las Mercedes (4°58'18.89" N and 74°52'66.11" W, altitude: 810 m a.s.l.) stations] of the Institute of Hydrology, Meteorology and Environmental Studies of Colombia (IDEAM).

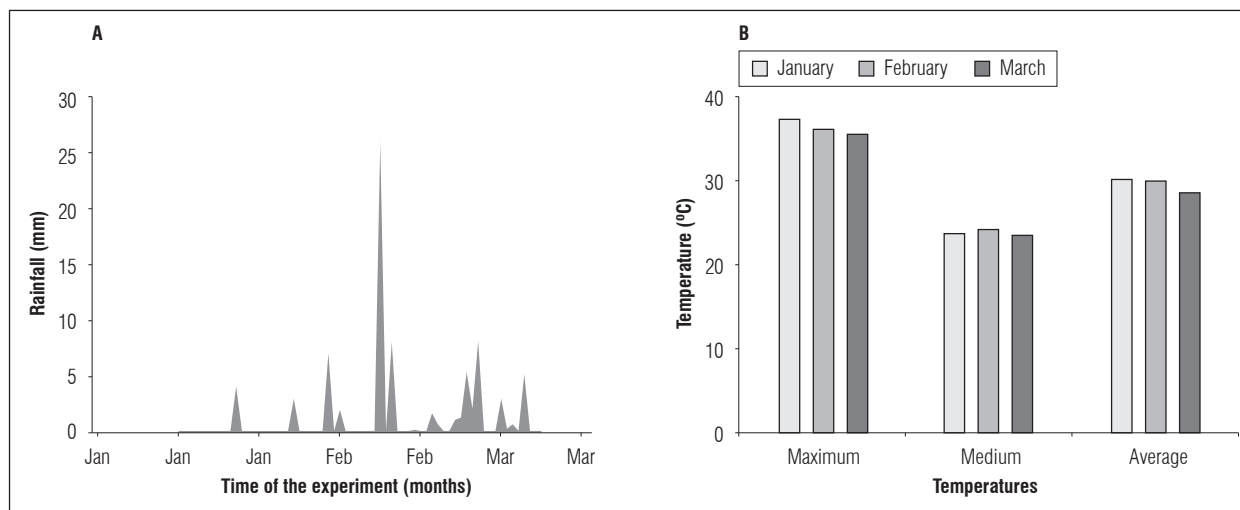
are summarized in figure 2. 'Tahiti' lime trees (*Citrus latifolia* Tanaka) were used, grafted on the 'Citrumelo 4475' pattern *Poncirus trifoliata* × *Citrus paradisi*, under drip irrigation conditions and aged 6 and 4 years, respectively. The treatments consisted of (1) control (trees without applications) and (2) trees foliarly treated with 100 g ha<sup>-1</sup> of clothianidin.

In general, all trees were spaced 8×5 m in all orchards. Also, the foliar applications of the insecticides were carried out (2 L/tree) at 0 and 4 weeks after the treatments started (WAT) with a pesticide sprayer backpack (Classic model, Royal Condor, Bogota, Colombia), wetting the upper and lower surfaces of the leaves. Finally, all the experiments lasted 9 weeks.

### Determined variables

The methodology described by Sétamou *et al.* (2008) was used to estimate the population variability of *D. citri*. The levels of *D. citri* adult, egg and nymph infestation were estimated with a random review of five young flushes per tree at the four cardinal points (north, south, east and west) on the field. Also, eggs and nymphs were counted and recorded per flush in situ using a 15X hand held lens. In general, samples were collected between 0 and 8 WAT at intervals of 7 d per sampling in all trials.

The procedure described by Henderson and Tilton (1955) was used to evaluate the efficacy of the



**Figure 2.** Rainfall records (A), and maximum, minimum and average temperatures (B) for the clothianidin evaluation located in the municipality of Jerusalen. Data were obtained from a nearby weather station [Jerusalen (4°56'18".06" N and 74°70'23.99" W, altitude: 297 m a.s.l.) station] of the Institute of Hydrology, Meteorology and Environmental Studies of Colombia (IDEAM).

treatments on the development of *D. citri* populations in the neonicotinoid and pyrethroid evaluation experiment. Overall, the efficacy percentage in each treatment was determined with the following formula:

$$\% \text{ Efficacy} = 100 \times \left( 1 - \frac{(Ta \times Cb)}{(Tb \times Ca)} \right) \quad (1)$$

Where, T is the treated population, C is the control population, a is the population after the treatment, and b is the population before the treatment.

### Statistical design

A statistical design in series of experiments, with analysis in different localities, was used in the present study for both experiments (Gómez and Gómez, 1984). On each farm, the treatments were randomly arranged in four blocks. The experiment unit consisted of three trees surrounded by guard trees. To analyze the *D. citri* population, a logarithmic transformation of the data was used because they did not show a normal distribution. Data expressed as percentages were transformed using the arcsine formula. The Tukey's test of mean comparison was used when significant differences were observed in the analysis of variance. The data were analyzed using the statistical program Statistix, v. 9 (Tallahassee, FL, USA).

## RESULTS

### Neonicotinoid and pyrethroid evaluation

Significant differences ( $P \leq 0.01$ ) in the population dynamics of *D. citri* adults were obtained with foliar neonicotinoid and pyrethroid applications, as compared to the control treatment between 1 and 7 WAT (Tab. 1). In general, the use of active ingredients of these two groups of insecticides reduced the adult population per flush by 50-60%. The control trees had  $\approx 1.14$  mean individuals per flush, whereas the trees treated with neonicotinoids and pyrethroids showed a mean number of individuals of between 0.53 and 0.61 throughout the trial (Tab. 4).

The dynamics of the *D. citri* nymphs were significantly higher in the control trees at 4, 6 and 7 WAT, as compared to the trees foliarly treated with insecticides of both groups (Tab. 2). A mean number of 2.25 nymphs per flush was observed in the control, compared to 0.82-1.22 individuals obtained in the insecticide treatments when the data were analyzed as mean *D. citri* nymphs per flush (Tab. 4). On the other hand, differences between the treatments were not obtained for the population dynamics of the *D. citri* eggs throughout the trial (Tab. 3). However, when analyzing the effect of the treatments performed as a mean number of eggs per flush, it was observed that the number of eggs was between 80 and 100% higher



**Table 1. Population dynamics of adults of ACP (individuals per flush) under different foliar applications of active ingredients in 'Tahiti' lime trees. Applications of treatments were done at 0 and 4 weeks after starting the treatments.**

Treatment	Weeks after treatments (WAT)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Control	1.05	1.09 a	0.85 a	1.05 a	1.20 a	1.08 a	1.32 a	1.22 a	1.45
Imidacloprid	0.99	0.30 b	0.24 b	0.70 ab	0.20 b	0.45 b	0.67 b	0.33 b	0.82
Bifenthrin	1.13	0.46 b	0.43 ab	0.68 ab	0.42 b	0.47 ab	0.52 b	0.57 ab	0.75
Thiamethoxan + Lambda cyhalothrin	1.01	0.51 ab	0.43 ab	0.66 ab	0.30 b	0.42 b	0.33 b	0.51 b	1.32
Deltamethrin	0.84	0.42 b	0.50 ab	0.38 b	0.30 b	0.47 ab	0.50 b	0.52 ab	1.10
Statistical analysis									
Treatment (T)	NS	**	*	*	***	*	***	**	NS
Locality (L)	NS	NS	NS	*	*	NS	NS	NS	NS
T x L	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS

Means with different letters indicate significant differences according to the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ).  
NS, \*, \*\* and \*\*\*: not significant and significant at  $P \leq 0.05$ , 0.01 and 0.001, respectively.

**Table 2. Population dynamics of nymphs of *Diaphorina citri* (individuals per flush) under different foliar applications of active ingredients in 'Tahiti' lime trees. Applications of treatments were done at 0 and 4 weeks after starting the treatments.**

Treatment	Weeks after treatments (WAT)								
	0*	1	2	3	4	5	6	7	8
Control	1.53	2.28	1.64	2.58	1.68 a	2.05	2.88 a	2.28 a	3.39
Imidacloprid	1.61	0.56	0.62	1.70	0.29 b	0.62	0.39 b	0.57 b	1.01
Bifenthrin	1.86	0.81	0.90	1.38	0.65 ab	0.65	0.84 b	0.66 b	1.62
Thiamethoxan + Lambda cyhalothrin	1.55	0.96	1.23	1.53	0.81 ab	0.93	1.22 ab	1.64 ab	1.14
Deltamethrin	1.47	0.95	1.40	1.74	0.51 b	0.76	0.77 b	0.80 b	1.97
Statistical analysis									
Treatment (T)	NS	NS	NS	NS	*	NS	**	*	NS
Locality (L)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
T x L	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Means with different letters indicate significant differences according to the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ).  
NS, \* and \*\*: not significant and significant at  $P \leq 0.05$  and 0.01, respectively.

**Table 3. Population dynamics of eggs of ACP (individuals per flush) under different foliar applications of active ingredients in 'Tahiti' lime trees. Applications of treatments were performed at 0 and 4 weeks after starting the treatments.**

Treatment	Weeks after treatments (WAT)								
	0*	1	2	3	4	5	6	7	8
Control	1.91	1.55	1.96	2.48	2.65	2.25	2.12	2.33	4.10
Imidacloprid	1.79	0.84	1.06	1.52	0.72	1.21	0.86	0.68	1.58
Bifenthrin	1.34	0.97	1.05	2.08	0.73	0.84	1.22	1.21	1.64
Thiamethoxan + Lambda cyhalothrin	2.53	1.28	1.73	1.96	0.90	1.67	1.99	1.39	2.53
Deltamethrin	2.38	0.88	0.98	2.74	1.28	1.96	1.68	1.31	2.42
Statistical analysis									
Treatment (T)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Locality (L)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
T x L	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS: not significant at  $P \leq 0.05$ .

in flushes of the control trees (2.37 mean individuals per flush) than in the treated trees (1.14-1.78 mean individuals per flush) (Tab. 4).

**Table 4. Individuals mean of ACP per flush under different foliar applications of active ingredients in 'Tahiti' lime trees.**

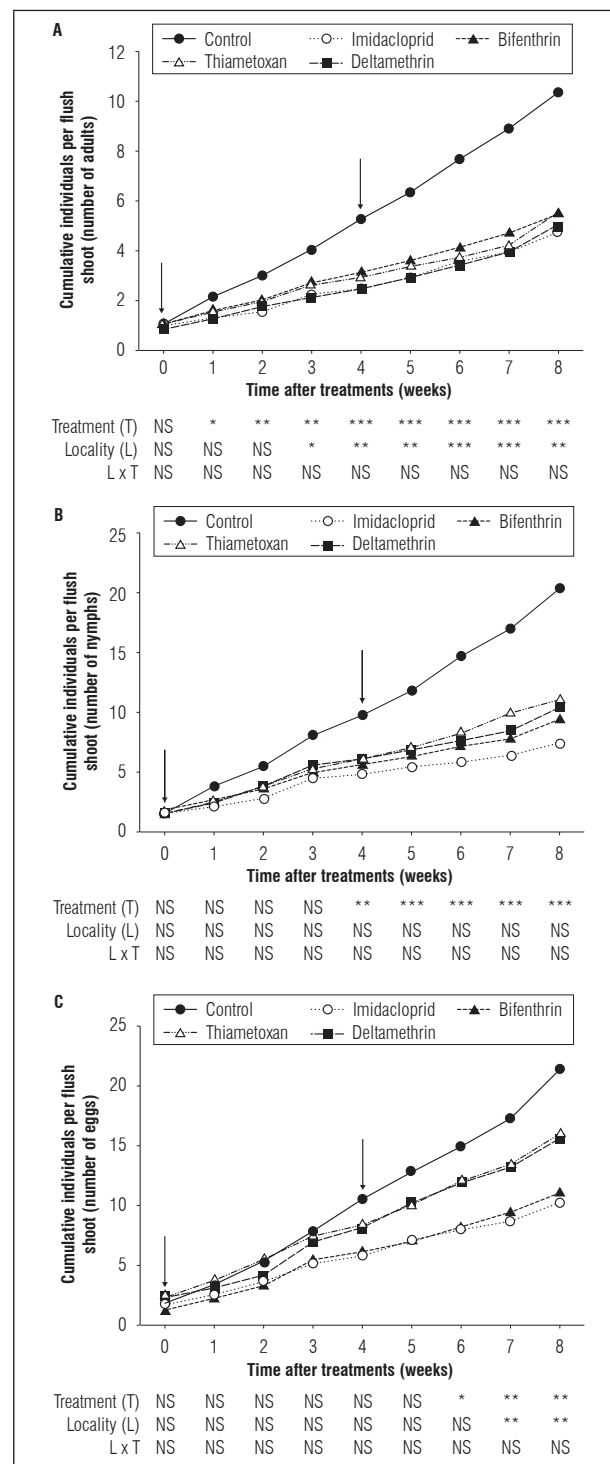
	Developmental stages		
	Adults	Nymphs	Eggs
Treatments			
Control	1.14 a	2.25 a	2.37 a
Imidacloprid	0.53 b	0.82 b	1.14 b
Bifenthrin	0.60 b	1.04 b	1.23 b
Thiamethoxan + Lambda Cyhalothrin	0.61 b	1.22 b	1.78 ab
Deltamethrin	0.56 b	1.15 b	1.74 ab
Locality			
Apulo	0.77 a	1.27	1.96 a
Jerusalén	0.61 b	1.33	1.34 b
Statistical analysis			
Treatment (T)	*** $\psi$	***	***
Locality (L)	**	NS	**
T x L	NS	NS	NS

Means with different letters represent statistically significant differences according to the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ).

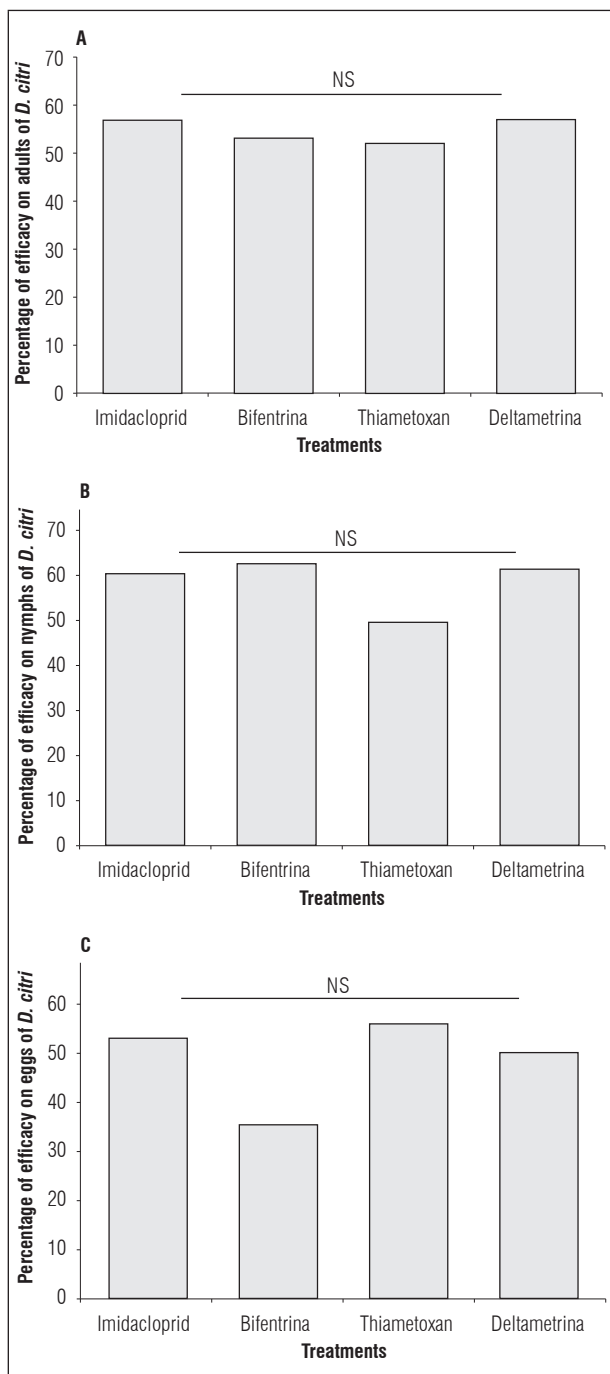
NS, \*\* and \*\*\*: not significant and significant at  $P \leq 0.01$  and  $0.001$ , respectively.

Figure 3 shows the differences between the patterns of accumulated adults, nymphs and eggs as a result of the treatments performed throughout the trial. For the accumulation of adults, a lower presence of total individuals ( $\approx 50\%$ ) was obtained in the trees with insecticide applications from 1 to 8 WAT (Fig. 3A). On the other hand, the nymph distribution was also conditioned by the use of neonicotinoids and pyrethroids, observing higher accumulations in the control trees from the 4 WAT (Fig. 3B). Finally, the use of insecticides had a more noticeable effect on the accumulation of eggs in flushes of the 'Tahiti' lime trees, where imidacloprid and bifenthrin caused a reduction of 75% on *D. citri* oviposition (Fig. 3C).

Differences were not obtained for the efficacy of the imidacloprid, thiamethoxan, bifenthrin and deltamethrin on adult, nymph and egg populations of *D. citri*. In general, the foliar application of both neonicotinoids and pyrethroids showed an efficacy of around 60% in the different stages of development of the insect (Fig. 4 A, B and C).



**Figure 3. Accumulated ACP individuals for adults (A), nymphs (B) and eggs (C) in *C. latifolia* trees as a result of foliar treatments of insecticides (control and chemical insecticides) in two localities.** NS Not significant; \*\*\*, \*\*, \* significant difference at  $P \leq 0.001$ ,  $0.01$  or  $0.05$  according to the Tukey test. The arrows indicate the timing of the foliar applications.

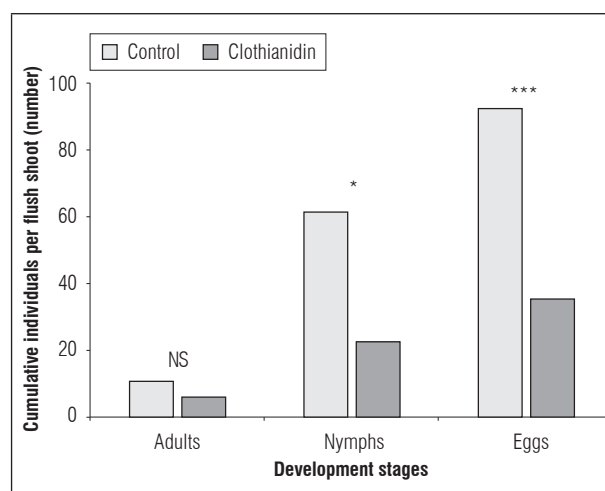


**Figure 4.** Efficacy percentage of the foliar treatments (neonicotinoids and pyrethroids) on adults (A), nymphs (B) and eggs (C) of ACP in *Citrus latifolia* trees. <sup>NS</sup> Not significant.

### Clothianidin evaluation

Table 5 shows the effect of the use of clothianidin on the population dynamics of *D. citri* adults, nymphs

and eggs during a period of 8 weeks. Differences were only observed for the adult number per flush at 7 WAT, where the trees treated with clothianidin showed 1.37 individuals per flush, as compared to 3.12 individuals recorded in the control tree flushes. However, the applications of this insecticide had a greater impact on nymph and egg populations, observing that the number of individuals was generally higher in the untreated trees throughout the trial. Similar trends were obtained when the population dynamics were represented as accumulated individuals where differences between nymphs and eggs were also observed as a result of the treatments (Fig. 5).



**Figure 5.** Accumulated individuals of *Diaphorina citri* (adults, nymphs and eggs) in *C. latifolia* trees as a result of the foliar treatments of insecticides (control vs. clothianidin) on two farms. <sup>NS</sup> Not significant; <sup>\*\*\*</sup> and <sup>\*</sup> significant difference at  $P \leq 0.001$  and 0.05 according to the Tukey test.

## DISCUSSION

With the report of the presence of the ACP in Colombia in 2007 and the declaration of the national phytosanitary emergency as a result of the presence of huanglongbing in 2017 (Santivañez *et al.*, 2013; ICA, 2017), the use of insecticides plays an important role in ACP management and the reduction of the spread and severity of HLB (Qureshi *et al.*, 2014). Foliar applications of neonicotinoids (clothianidin, imidacloprid and thiametoxan) have been documented as a tool within IPM programs for the control of ACP populations because they have higher protection (8-9 weeks) (Boina and Bloomquist, 2015). Also, the effect of insecticides belonging to the group of pyrethroids

**Table 5. Population dynamics of adults, nymphs and eggs of ACP (individuals per flush) in 'Tahiti' lime trees treated with insecticide (Clothianidin) and control. Applications of treatments were done at 0 and 4 weeks after starting the treatment.**

	Weeks after treatments (WAT)								
	0 <sup>w</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8
	<b>Adults</b>								
Control	1.00	1.00	0.75	0.87	1.50	1.37	1.25	3.12	0.75
Clothianidin	1.25	0.38	0.38	0.75	0.50	0.62	0.87	1.37	0.37
	<b>Statistical analysis</b>								
Treatment (T)	NS <sup>2</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS
Farm (F)	*	*	*	NS	**	NS	**	NS	NS
T x F	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	<b>Nymphs</b>								
Control	4.37	6.50	9.25	6.87	7.62	6.00	7.62	13.50	29.15
Clothianidin	4.87	2.25	2.37	1.75	1.62	2.62	2.87	4.37	15.12
	<b>Statistical analysis</b>								
Treatment (T)	NS	*	*	*	**	NS	*	*	*
Farm (F)	NS	*	**	*	NS	NS	NS	NS	NS
T x F	NS	NS	*	*	NS	NS	NS	NS	NS
	<b>Eggs</b>								
Control	10.12	8.37	6.75	10.25	10.87	11.12	13.37	22.00	29.87
Clothianidin	8.87	1.75	2.75	1.75	2.37	5.12	4.62	8.37	11.75
	<b>Statistical analysis</b>								
Treatment (T)	NS	***	*	**	***	*	**	**	*
Farm (F)	**	*	NS	NS	**	NS	**	NS	**
T x F	*	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS, \*, \*\* and \*\*\*: not significant and significant at  $P \leq 0.05$ ; 0.01 and 0.01, respectively.

(bifenthrin and deltamethrin) has also been evaluated for consideration in management programs of this insect in citrus crops in recent years (Yamamoto *et al.*, 2009; Chen and Stelinski, 2017a). Consequently, field studies that evaluate a wide range of products with different action mechanisms that allow product rotations with the purpose of reducing populations and delaying resistance processes are necessary for growers (Qureshi *et al.*, 2014; Chen and Stelinski, 2017b).

The application of imidacloprid showed a higher control effect on the population of accumulated eggs and nymphs, as compared to the other treatments in the present study (Fig. 1 and 3). The above could be due to the fact that imidacloprid can remain active in leaf tissue for 6 to 8 weeks (Castle *et al.*, 2005). Studies carried out by Gatineau *et al.* (2010) also observed that the use of imidacloprid mainly affected

the development of immature states. Qureshi *et al.* (2014) observed a reduction of 76-100% in the population of nymphs when *Citrus sinensis* (L.) trees were treated with neonicotinoids (imidacloprid). Boina *et al.* (2009) reported that ACP populations can be exposed to sub-lethal concentrations of systemic insecticides such as imidacloprid because the residuality of this molecule in citrus trees over time, which may affect the biology of the insect. The same authors also stated that sub-lethal concentrations of imidacloprid affected the longevity, fertility and fecundity of APC adults, as well as the time of development and survival of nymphs.

Pyrethroids are neurotoxic insecticides widely used in crop protection (Davies *et al.*, 2007). In the present study, the use of bifenthrin and deltamethrin showed efficacy percentages around 60% in the control of *D. citri* adults and nymphs. Pardo *et al.* (2017)

also observed susceptibility in ACP adult and nymph populations as a result of the use of bifenthrin and argued that this susceptibility may be due to the fact that this compound has been little used in the studied region. The above information can also help to understand the low resistance that *D. citri* presented in the area of the present study since a reduction of the susceptibility of the insect under a high use of this molecule has been reported in other locations in the Americas (Chen and Stelinski, 2017a).

Clothianidin had a mainly ovicidal effect over time (Tab. 5). Hoffmann *et al.* (2008) also reported that foliar applications of this molecule had an ovicidal effect on *Conotrachelus nenuphar*. The ovicidal activity may be related to the octanol-water partition coefficient ( $K_{ow}$ ) of this compound since the lipid layers of the insect chorion provide a general barrier for hydrophilic compounds (low  $K_{ow}$ ) (Smith and Salkeld, 1966). Clothianidin has a positive distribution coefficient and, therefore, is able to move through the chorion better (Hoffmann *et al.*, 2008).

In summary, the present study showed that foliar applications of pyrethroids (bifenthrin) and neonicotinoids (imidacloprid) had a percentage of efficacy higher than or equal to 60% over the control of ACP adults and nymphs. On the other hand, the use of clothianidin showed a higher control of eggs. The results suggest that the rotation of these active ingredients could be a tool to reduce populations and delay resistance processes to reduce the spread of HLB in 'Tahiti' lime orchards established under tropical dry forest conditions.

**Conflict of interests:** this manuscript was prepared and reviewed with the participation of the authors, who declare that there exists no conflict of interest that puts the validity of the presented results at risk.

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Boina, D.R., E.O. Onagbola, M. Salyani, and L.L. Stelinski. 2009. Antifeedant and sublethal effects of imidacloprid on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Pest Manag. Sci.* 65, 870-877. Doi: 10.1002/ps.1767
- Boina, D.R. and J.R. Bloomquist. 2015. Chemical control of the Asian Citrus Psyllid and of Huanglongbing disease in citrus. *Pest Manag. Sci.* 71, 808-823. Doi: 10.1002/ps.3957
- Castle, J.S., F.J. Byrne, J.L. Bi, and N.C. Toscano. 2005. Spatial and temporal distribution of imidacloprid and thiamethoxam in citrus and impact on *Homalodisca* *coagulata* populations. *Pest Manag. Sci.* 61, 75-84. Doi: 10.1002/ps.949
- Chen, X.D. and L.L. Stelinski. 2017a. Rapid detection of insecticide resistance in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) populations, using a bottle bioassay. *Fla. Entomol.* 100, 124-133. Doi: 10.1653/024.100.0118
- Chen, X.D. and L.L. Stelinski. 2017b. Resistance management for Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, in Florida. *Insects* 8, 103. Doi: 10.3390/insects8030103
- Cocco, A. and M.A. Hoy. 2008. Toxicity of organosilicone adjuvants and selected pesticides to the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) and its parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). *Fla. Entomol.* 9, 610-620. Doi: 10.1653/0015-4040-91.4.610
- Davies, T.G.E., L.M. Field, P.N.R. Usherwood, and M.S. Williamson. 2007. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB life* 59, 151-162. Doi: 10.1080/15216540701352042
- Ebratt-Ravelo, E.E., L.T. Rubio-González, V.A. Costa, A.P. Castro-Ávila, E.M. Zambrano-Gómez, and J.E. Ángel-Díaz. 2011. *Diaphorina citri* (Kuwayama, 1907) and *Tamarixia radiata* (Waterson, 1922) in citrus crops of Cundinamarca, Colombia. *Agron. Colomb.* 29, 487-493.
- Elbert, A., M. Haas, B. Springer, W. Thielert, and R. Nauen. 2008. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Manag. Sci.* 64, 1099-1105. Doi: 10.1002/ps.1616
- Gatineau, F., F. Bonnot, T.T.H. Yen, N.D. Tuyen, and N.T.N. Truc. 2010. Effects of imidacloprid and fenobucarb on the dynamics of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama and on the incidence of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Fruits* 65, 209-220. Doi: 10.1051/fruits/2010017
- Gómez, K.A. and A.A. Gómez AA. 1984. Statistical procedures for agricultural research. John Wiley & Sons, Toronto, Canada.
- Henderson, C.F. and E.W. Tilton. 1955. Tests with acaricides against the brown wheat mite. *J. Econ. Entomol.* 48, 157-161. Doi: 10.1093/jee/48.2.157
- Hernández-Fuentes, L.M., M.A. Urias-López, J.I. López-Arroyo, R. Gómez-Jaimes, and N. Bautista-Martínez. 2012. Control químico de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en Lima Persea *Citrus latifolia* Tanaka. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 3, 427-439.
- Hoffmann, E.J., S.M. Middleton, and J.C. Wise. 2008. Ovicidal activity of organophosphate, oxadiazine, neonicotinoid and insect growth regulator chemistries on northern strain plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*. *J. Insect Sci.* 8, 1-6. Doi: 10.1673/031.008.2901
- ICA (Instituto Colombiano Agropecuario). 2015. Resolución 2390 de 2015, Por medio de la cual se declara el estado de emergencia fitosanitaria en el territorio



- nacional por la presencia de adultos de *Diaphorina citri* infectados con la bacteria de la enfermedad del HLB de los cítricos. Bogota, Colombia.
- ICA (Instituto Colombiano Agropecuario). 2017. Resolución número 00007109 de 2017, por medio de la cual se declara el estado de emergencia fitosanitaria en el territorio nacional por la presencia de la enfermedad conocida como Huanglongbing (HLB) de los cítricos. Bogota, Colombia.
- Langdon, K.W. and M.E. Rogers. 2017. Neonicotinoid-induced mortality of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) is affected by route of exposure. *J. Econ. Entomol.* 110, 2229-2234. Doi: 10.1093/jee/tox231
- Maienfish, P., M. Angst, F. Brand, W. Fischer, D. Hofer, H. Kayser, W. Kobel, A. Rindlisbacher, R. Senn, A. Steinemann, and H. Widmer 2001. Chemistry and biology of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid. *Pest Manag. Sci.* 57, 906-913. Doi: 10.1002/ps.365
- Pardo, S., A.M. Martínez, J.I. Figueroa, J.M. Chavarrieta, E. Viñuela, Á. Rebollar-Alviter, M.A. Miranda, J. Valle, and S. Pineda. 2017. Insecticide resistance of adults and nymphs of Asian Citrus Psyllid populations from Apatzingán Valley, Mexico. *Pest Manag. Sci.* 74, 135-140. Doi: 10.1002/ps.4669
- Qureshi, J.A., B.C. Kostyk, and P.A. Stansly. 2009. Control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) with foliar and soil-applied insecticides. *P. Fl. St. Hortic. Soc.* 122, 189-193.
- Qureshi, J.A., B.C. Kostyk, and P.A. Stansly. 2014. Insecticidal suppression of Asian Citrus Psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) vector of huanglongbing pathogens. *PloS One* 9, e112331. Doi: 10.1371/journal.pone.0112331
- Ruiz-Galván, I., N. Bautista-Martínez, H. Sánchez-Arroyo, and F.A. Valenzuela-Escoboza. 2015. Control químico de *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Liviidae) en lima persa. *Acta Zool. Mex.* 31, 41-47. Doi: 10.21829/azm.2015.311503
- Santivañez, T., G. Mora Aguilera, G. Diaz Pinilla, J.I. López Arrollo, and P. Vernal Hurtado. 2013. Citrus. Marco estratégico para la gestión regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe. FAO, Santiago.
- Sétamou, M., D. Flores, J.V. French, and D.G. Hall. 2008. Dispersion patterns and sampling plans for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in citrus. *J. Econ. Entomol.* 101, 1473-1487. Doi: 10.1093/jee/101.4.1478
- Sétamou, M., D. Rodriguez, R. Saldana, G. Schwarzlose, D. Palrang, and S.D. Nelson. 2010. Efficacy and uptake of soil-applied imidacloprid in the control of Asian Citrus Psyllid and a citrus leafminer, two foliar-feeding citrus pests. *J. Econ. Entomol.* 103, 1711-1719. Doi: 10.1603/EC09371
- Smith, E.H. and E.H. Salkeld. 1966. The use and action of ovicides. *Annu. Rev. Entomol.* 11, 331-368. Doi: 10.1146/annurev.en.11.010166.001555
- Stansly, P.A., J.A. Qureshi, and B.C. Kostyk. 2015. Evaluation of organophosphate and pyrethroid insecticides for control of Asian Citrus Psyllid and citrus leafminer on oranges, summer, 2014. *Arthropod Manag. Tests* 40, 1-2. Doi: 10.1093/amt/tsv045
- Tiwari, S., R.S. Mann, M.E. Rogers, and L.L. Stelinski. 2011. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. *Pest Manag. Sci.* 67, 1258-1268. Doi: 10.1002/ps.2181
- Yamamoto, P.T., M.R. Fellipe, A.L. Sanches, J.H. Coelho, L.F. Garbim, and N.L. Ximenes. 2009. Eficácia de inseticidas para o manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em citros. *BioAssay* 4, 1-9. Doi: 10.14295/BA.v4.0.21

# Comportamiento poscosecha de frutos de mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) var. Arrayana: efecto de diferentes tratamientos térmicos

Postharvest behavior of mandarin fruits (*Citrus reticulata* Blanco) var. Arrayana: effect of different thermal treatments



HELBER ENRIQUE BALAGUERA-LÓPEZ<sup>1, 2, 3</sup>  
EDGAR ALFONSO PALACIOS O.<sup>2</sup>

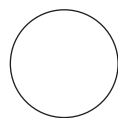
**Frutos de mandarina 'Arrayana'.**

Foto: H.E. Balaguera-López

## RESUMEN

La mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) 'Arrayana' es una de las variedades más importantes en el país, sin embargo, las pérdidas en poscosecha son altas por la alta perecibilidad del fruto. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes tratamientos térmicos sobre el comportamiento poscosecha de frutos de mandarina var. Arrayana almacenados a 2°C durante 40 días. Se utilizó un diseño completamente al azar, donde se evaluaron los siguientes tratamientos térmicos: (T1) frutos testigo, (T2) frutos tratados con agua caliente a 50°C durante 5 minutos, (T3) frutos tratados con agua caliente a 53°C durante 3 minutos, (T4) frutos sometidos a calentamiento intermitente con ciclos de 8 días a 2°C + 1 día a 18°C y (T5) frutos sometidos a calentamiento intermitente con ciclos de 12 días a 2°C + 1 día a 18°C. Durante el almacenamiento no se presentaron síntomas de daños por frío visibles. Al final de almacenamiento, no hubo diferencias estadísticas en los azúcares sacarosa, fructosa y glucosa, la acidez total titulable, los ácidos cítrico, málico y ascórbico ni los sólidos solubles totales. El calentamiento intermitente se caracterizó por aumentar las pérdidas de peso de los frutos y la tasa respiratoria, pero generó mejor coloración de los frutos porque indujo mayor cambio de color de la epidermis al presentar mayor acumulación de carotenoides totales y una baja concentración de clorofilas.

**Palabras clave adicionales:** cítricos, calentamiento intermitente, tratamiento con agua caliente, daños por frío, fruto no climatérico, maduración.



<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Grupo de Investigaciones Agrícolas, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Tunja (Colombia). ORCID Balaguera-López, H.E.: 0000-0003-3133-0355

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias, Programa de Biología, Grupo de Investigación de Biología de la Universidad El Bosque (GRIB), Universidad El Bosque, Bogotá (Colombia). ORCID Palacios O., E.A.: 0000-0003-3349-824X

<sup>3</sup> Autor para correspondencia. hbalaguera@unbosque.edu.co



## ABSTRACT

Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) 'Arrayana' is one of the most important varieties in the country; however, postharvest losses are high as a result of the high perishability of the fruit. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of different thermal treatments on the postharvest behavior of mandarin fruits var. Arrayana stored at 2°C for 40 days. A completely randomized design was used, where the following thermal treatments were evaluated: (T1) control fruits, (T2) fruits treated with hot water at 50°C for 5 minutes, (T3) fruits treated with hot water at 53°C for 3 minutes, (T4) fruits subjected to intermittent warming with cycles of 8 days at 2°C + 1 day at 18°C and (T5) fruits subjected to intermittent warming with cycles of 12 days at 2°C + 1 day at 18°C. During storage there were no visible symptoms of chilling injury. At the end of storage, there were no statistical differences in sucrose, fructose and glucose, titratable acidity, citric, malic and ascorbic acids or total soluble solids. The intermittent warming was characterized by increasing fruit weight loss and respiratory rate, but it generated better fruit coloration because it induced a greater color change of the epidermis when there was a greater accumulation of total carotenoids and a low concentration of chlorophylls.

**Additional key words:** citrics, intermittent warming, hot water treatment, chilling injury, non-climacteric fruit, ripening.

Fecha de recepción: 03-02-2018 Aprobado para publicación: 30-05-2018

## INTRODUCCIÓN

La mandarina 'Arrayana' es la variedad que más se cultiva en Colombia (Ordúz-Rodríguez *et al.*, 2012; Chaparro-Zambrano *et al.*, 2017). Es una variedad adaptada a trópico bajo, su fruto es reconocido por sus atributos gustativos, su apariencia externa y comercial (Ordúz-Rodríguez *et al.*, 2012). En Colombia, los cítricos, incluyendo la mandarina presentan altas pérdidas en poscosecha que están entre un 12% a 25%, lo cual se debe, entre otros factores, al deficiente manejo poscosecha que existe en el país, por tanto, para reducir las pérdidas de frutos es importante comprender los factores de tipo biológico y ambiental implicados en la degradación del fruto, así como conocer y utilizar la tecnología poscosecha más adecuada para retrasar la senescencia del producto y mantener la calidad por más tiempo (Carvalho *et al.*, 2012).

La conservación en la que se emplea baja temperatura es la tecnología más utilizada y eficaz para disminuir el deterioro poscosecha de productos hortofrutícolas, ya que reduce las pérdidas comerciales durante el almacenamiento (Lado *et al.*, 2015). Sin embargo, los cítricos presentan susceptibilidad a las bajas temperaturas causando alteraciones o manchas en la epidermis, estos cambios, se les conocen como daños por frío y pueden generar altas pérdidas de calidad comercial (Carvalho *et al.*, 2012). En general los frutos

de las diferentes especies de cítricos y cultivares son sensibles a daños por frío cuando se almacenan por debajo de 10°C (Lafuente y Zacarías, 2006). Al respecto, Ladaniya (2008) recomienda temperaturas de almacenamiento para mandarinas 'Ellendale', 'Murcott' y 'Nagpur' entre 6 y 7°C.

Para evitar los daños por frío es recomendable el almacenamiento a temperaturas por encima del umbral para evitar el desarrollo de esta fisiopatía. El problema, es que esto limita la supervivencia comercial del producto, al estar almacenado a una temperatura relativamente elevada para ralentizar los procesos fisiológicos, por tal razón, una solución viable es la aplicación de tratamientos térmicos que disminuyan la sensibilidad de los frutos de mandarina a los daños por frío durante o después del almacenamiento a bajas temperaturas. Se han reportado varios tratamientos poscosecha para reducir los síntomas de daños por frío, estos incluyen el calentamiento intermitente, el vapor y el agua caliente (Sala y Lafuente, 2000; Fallik, 2004; Liu *et al.*, 2015).

El calentamiento intermitente es un tratamiento que consiste en refrigerar los frutos y periódicamente llevarlos a otro ambiente de mayor temperatura durante unas horas o días, con el fin de hacer reversible los

procesos iniciales de daños por frío a nivel fisiológico que ya han ocurrido, pero que no se han manifestado en forma de síntomas. Posteriormente, se vuelve a bajar la temperatura para beneficiarse de la refrigeración en la supervivencia del producto (Artés y Artés-Hernández, 2002). Este tratamiento ha sido utilizado con resultados favorables en naranja 'Navelate' (Artés *et al.*, 1998). No obstante, Crisosto *et al.* (2008) mencionan que un calentamiento intermitente incorrecto evita que el fruto recupere sus funciones metabólicas, generando una senescencia acelerada. Esto indica la importancia de encontrar una recomendación precisa a la hora de llevar a cabo el calentamiento intermitente.

Por su parte, los tratamientos térmicos mediante inmersión en agua caliente también son eficaces para inducir tolerancia al frío en frutos, mediante la modulación de los sistemas antioxidantes, encargados de prevenir la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Sala y Lafuente, 2000; Ma *et al.*, 2014). Este tipo de tratamiento puede aumentar la producción y activación de proteínas de choque térmico tal como lo indican Rozenzvieg *et al.* (2004), y algunas de estas proteínas pueden actuar como chaperonas, involucradas en el plegamiento, ensamblaje y transporte de proteínas (Rozenzvieg *et al.*, 2004), muchas de las cuales están presentes y tienen funciones biológicas en la membrana celular, evitando de esta manera un mayor daño aún en condiciones de bajas temperaturas en este importante organelo celular. Investigadores como Ghasemnezhad *et al.* (2008) en mandarina 'Satsuma', encontraron resultados favorables con agua a 47,5°C por 2 o 5 min y con agua a 50°C por 2 min. De acuerdo con Holland *et al.* (2012) tiempos prolongados y altas temperaturas del tratamiento térmico con agua pueden generar efectos negativos en la calidad de los frutos. No obstante, tanto el tiempo como la temperatura del tratamiento dependerá de la especie, el tamaño, estado de madurez, entre otros (Ma *et al.*, 2014).

En este estudio se quiere hacer énfasis en el efecto que puedan tener los tratamientos térmicos sobre el comportamiento poscosecha de los frutos, es así como Shadmani *et al.* (2015) mencionan el carácter de los tratamientos térmicos en el retraso del proceso de maduración de los frutos. Al respecto, Ghasemnezhad *et al.* (2008) reportan que en mandarina 'Satsuma', el tratamiento con agua caliente a 50 o 55°C por 2 min disminuyó la tasa respiratoria y también la producción de etileno, pero no afectó la acidez. Mientras que Schirra *et al.* (2004) observaron que el

tratamiento térmico con agua caliente no afectó los sólidos solubles totales, la acidez total titulable y el ácido ascórbico en naranja 'Valencia'. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes tratamientos térmicos sobre el comportamiento poscosecha de frutos de mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) var. Arrayana almacenados a 2°C.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los frutos de mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) 'Arrayana' fueron obtenidos de cultivos comerciales del municipio de Apulo, Cundinamarca (Colombia). Los frutos fueron recolectados en madurez de cosecha, con los parámetros que se muestran en la tabla 1. El experimento se realizó en el Laboratorio de Investigación en Biología de la Universidad El Bosque y en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

**Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de los frutos de mandarina 'Arrayana' al inicio del almacenamiento.**

Parámetro	Valor
Peso (g)	112,77±12,76
Índice de color de la epidermis (IC=1.000×a*/L*×b*)	3,34±1,6
Acidez total titulable (%)	0,83±0,3
Sólidos solubles totales (°Brix)	11,82±1,5
Tasa respiratoria (mg CO <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	1,94±0,22

Promedio de 10 frutos ± desviación estándar.

Se utilizó un diseño completamente al azar y se evaluaron los siguientes tratamientos térmicos: (T1) frutos sin tratamiento térmico, (T2) frutos tratados con agua caliente a 50°C durante 5 min, (T3) frutos tratados con agua caliente a 53°C durante 3 min, (T4) frutos sometidos a calentamiento intermitente con ciclos de 8 d a 2°C + 1 d a 18°C y (T5) frutos sometidos a calentamiento intermitente con ciclos de 12 d a 2°C + 1 d a 18°C. Los tratamientos con agua caliente se realizaron previo al almacenamiento refrigerado. Cada uno de los tratamientos se repitió cuatro veces, para un total de 20 unidades experimentales, y cada unidad experimental estuvo compuesta por aproximadamente 2 kg de fruta.

Los frutos se almacenaron a 2±0,5°C durante 40 d. Periódicamente se determinaron las siguientes variables: tasa de respiración, los frutos fueron puestos en una cámara hermética de 2 L, donde la emisión de

CO<sub>2</sub> producto de la respiración se determinó mediante sensores infrarrojo de CO<sub>2</sub> acoplados a un sistema de captura de datos denominado Labquest (Vernier Software & Technology, Beaverton, OR, USA), fue necesario registrar el peso de la muestra para finalmente expresar la respiración en mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Balaguera-López *et al.*, 2016). La pérdida de peso (%) se realizó a través de medición de la masa fresca a los frutos en balanza de precisión con aproximación de 0,001 g.

Al cabo de los 40 d de almacenamiento se determinó lo siguiente: índice de daños por frío, siguiendo la metodología reportada por Balaguera (2015). Para determinar carotenoides y clorofilas totales, se pesó alrededor de 1 g de epidermis, se agregaron 5 mL de acetona, se agitó en vórtex durante 1 min y luego se centrifugó durante 10 min a 4.000 rpm. Luego se ubicó el sobrenadante en un balón de 20 mL, al pellet nuevamente se le adicionó acetona, repitiendo el anterior paso hasta que el pellet quedó incoloro. El sobrenadante se llevó a volumen de 20 mL con acetona, posteriormente se midió la absorbancia en espectrofotómetro (UV-VIS Genesys 10; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 450 nm para carotenoides y a 663 y 645 nm para clorofilas.

Para la firmeza (N), se hicieron dos mediciones en la zona ecuatorial del fruto mediante el uso de un penetrómetro digital (PCE-PTR200; PCE Instruments, Alicante, España), con puntal de 6 mm y precisión de  $\pm 0,5\%$ . Para el color de la epidermis, se calculó la diferencia o delta de color de acuerdo con la metodología utilizada por Mendoza *et al.* (2006), para lo cual, se determinaron los parámetros del sistema CIELab "L\*", "a\*" y "b\*" en tres puntos equidistantes del fruto mediante colorímetro digital CR-20 (Konica Minolta, Tokyo, Japón). Mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se cuantificó el contenido de sacarosa, fructosa y glucosa y ácidos orgánicos (cítrico, málico, oxálico y ascórbico), se utilizó cromatógrafo HPLC Ultimate 3000 Dionex (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), equipado con columna Hypersil Gold Amino 250 x 4,6 x 5  $\mu\text{m}$ , detector DAD en 4 canales (210, 240, 272 y 280 nm); índice de refracción (35°C) y como fase móvil acetone-triiló-agua 75:25 1,5 mL/min. La acidez total titulable (ATT) se cuantificó a través de titulación ácido base con NaOH (0,1 N), utilizando bureta digital y los sólidos solubles totales (SST, °Brix) con un refractómetro digital marca Hanna (Hanna Instruments, Eibar, España) de rango 0 a 85% con precisión de 0,1 °Brix.

El análisis de los datos se realizó con el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v. 19, se determinaron las pruebas de normalidad (test de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (test de Levene), luego del cumplimiento de los anteriores supuestos se realizó un análisis de varianza y posteriormente la prueba de comparación de rangos múltiples de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

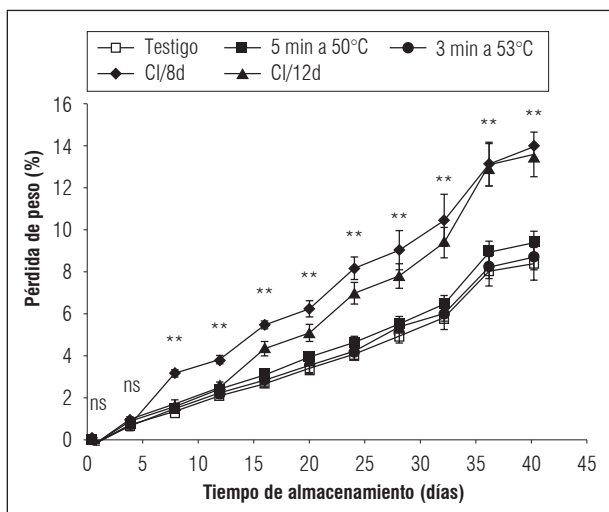
Es importante mencionar que durante los 40 d almacenamiento refrigerado a 2°C, los frutos de mandarina 'Arrayana' no presentaron síntomas de daños por frío visibles. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Schirra y Cohen (1999), quienes mencionan que en algunos casos, los síntomas de daños por frío son visibles en los productos que han sido removidos del almacenamiento refrigerado a temperaturas superiores a las de almacenamiento. Por el contrario, Ghasemnezhad *et al.* (2008) reportaron daños por frío durante el almacenamiento refrigerado a 2°C en mandarina 'Satsuma'. Esto indica que hay factores genéticos que determinan la susceptibilidad a los daños por frío, pero sin olvidar también que dicha susceptibilidad también está dada por factores precosecha y manejo, durante el almacenamiento.

### Pérdida de peso

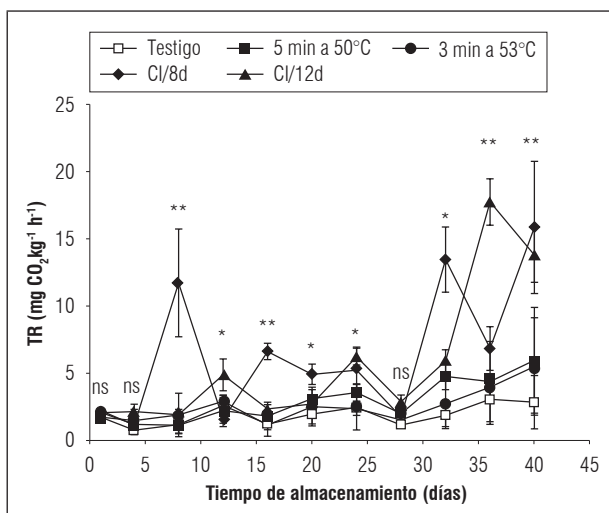
Se presentó pérdida de peso en todos los tratamientos, con diferencias estadísticas ( $P \leq 0,01$ ) a partir de los 8 d de almacenamiento. Durante todo el almacenamiento la mayor pérdida de peso se obtuvo en los frutos sometidos a calentamiento intermitente de 8 d con una pérdida de  $13,93 \pm 1,02\%$  seguido muy de cerca del calentamiento intermitente cada 12 d, mientras que los frutos sin tratamiento térmico (testigo) llegaron a una pérdida final del 8,43%, sin diferencias estadísticas con los frutos sometidos a inmersión en agua caliente (Fig. 1). Resultados similares fueron encontrados por Hong *et al.* (2007), quienes mencionan que en mandarina 'Satsuma', el tratamiento con agua caliente no afectó la pérdida de peso.

La pérdida de agua por transpiración es la principal causa de disminución de peso de los productos vegetales en poscosecha, como segunda causa está la pérdida de materia seca por procesos respiratorios (Kader, 2002). Por lo que se puede inferir que en los frutos sometidos a calentamiento intermitente la transpiración





**Figura 1.** Pérdida de peso en frutos de mandarina 'Arrayana' almacenados a 2°C con diferentes tratamientos térmicos. Inmersión con agua caliente en tratamientos de 5 y 3 min. CI: calentamiento intermitente. ns: sin diferencia estadística; \*\* diferencias estadísticas al 1%. Las barras indican error estándar.



**Figura 2.** Tasa respiratoria (TR) de frutos de mandarina 'Arrayana' almacenados a 2°C con diferentes tratamientos térmicos. Inmersión con agua caliente en tratamientos de 5 y 3 min. CI: calentamiento intermitente. ns: sin diferencias estadísticas; \* diferencias estadísticas al 5%; \*\* diferencias estadísticas al 1%. Las barras indican error estándar.

fue mayor, además de que presentó la mayor tasa respiratoria (Fig. 2) debido al traslado periódico de dichos frutos a temperatura ambiente, condición que

aumenta la transpiración y respiración de los frutos. Pues según Hernández-Muñoz *et al.* (2008), la temperatura de almacenamiento determina la transpiración de los tejidos. Por esta razón, debe pensarse en mejorar la técnica del calentamiento intermitente, por ejemplo encerrando los frutos, ya que de acuerdo con Kader (2002), la pérdida de agua es la principal causa del deterioro del fruto porque conlleva a la disminución directa del peso fresco y la calidad, asimismo, disminuye la vida en almacenamiento debido a que se aceleran los cambios durante la maduración y la senescencia.

Los resultados también se relacionan con lo observado por Bassal y El-Hamahmy (2011) quienes indican que los tratamientos térmicos pueden incrementar o disminuir las pérdidas de peso de los frutos, dependiendo del tratamiento y el producto agrícola, principalmente por la respuesta particular de cada fruto al tratamiento con calor.

### Tasa respiratoria

Se presentaron diferencias estadísticas en casi todos los puntos de muestreo, con excepción de los días 1, 4 y 28 de almacenamiento. Fue característico encontrar aumentos representativos en la tasa respiratoria de los frutos sometidos a calentamiento intermitente en los días que fueron expuestos a temperatura ambiente, lo cual también explica la mayor pérdida de peso en estos tratamientos. Los frutos de los demás tratamientos mantuvieron una tasa respiración más o menos estable durante el almacenamiento con un leve aumento después del día 28 (Fig. 2).

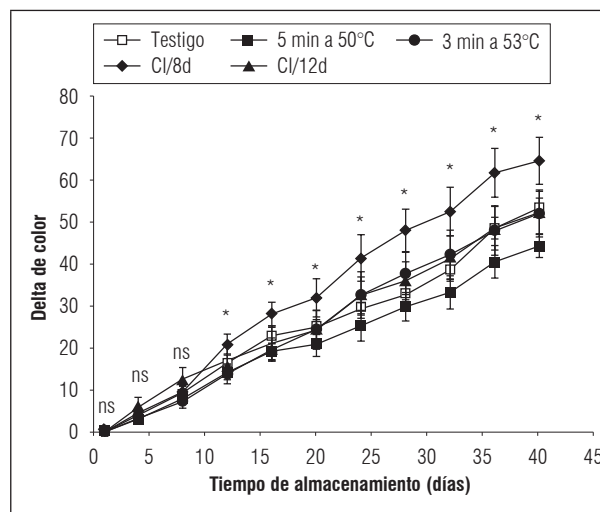
Estudios realizados por Balaguera-López *et al.* (2015) en frutos de uchuva, permitieron determinar que la respiración está relacionada con la temperatura, de tal manera que a mayor temperatura la respiración fue mayor, comportamiento que se ha encontrado en diferentes productos agrícolas y que explican lo ocurrido en los frutos de mandarina con los tratamientos de calentamiento intermitente, pues estos tratamientos a diferencia de los tratamientos con agua caliente e incluso el tratamiento testigo, periódicamente son sometidos a mayores temperaturas al retirarse de manera cíclica del almacenamiento refrigerado a temperatura ambiente. A pesar de que los frutos de mandarina son frutos no climatéricos, es importante mantener tasas respiratorias bajas para reducir la actividad metabólica del fruto, para conservar la calidad del fruto y retardar los procesos de senescencia (Pereira *et al.*, 2013). En este orden de ideas, los

tratamientos con agua caliente serían más ventajosos que el calentamiento intermitente por mantener tasas respiratorias más bajas, al parecer debido a que la alta temperatura del agua caliente puede reducir o eliminar la actividad enzimática, lo cual afecta la tasa respiratoria, tal como lo mencionan Alegria *et al.* (2012).

### Color y pigmentos

El cambio de color de la epidermis en los frutos de mandarina mostró un aumento constante en función del tiempo de almacenamiento. Con la inmersión en agua caliente por 5 min a 50°C se encontró significativamente ( $P \leq 0,05$ ) menor al cambio de color, por otro lado, el calentamiento intermitente cada 8 d generó mayor delta de color en los frutos (Fig. 3). Este tratamiento también fue responsable de mayor contenido de carotenoides totales con un valor de 976,6  $\mu\text{g g}^{-1}$ , también con diferencias significativas entre los tratamientos (Tab. 2). En relación a la clorofila total, los frutos de los tratamientos de inmersión en agua caliente durante 3 min a 53°C y de calentamiento intermitente cada 12 d presentaron la menor concentración de clorofilas, los frutos de los demás tratamientos fueron significativamente superiores (Tab. 2).

Los tratamientos térmicos con agua caliente tienen la posibilidad de afectar la síntesis de etileno, pues Lurie *et al.* (1996) afirman que con temperaturas superiores a 38°C se disminuyó la abundancia de mRNA de la enzima formadora de etileno ACC oxidasa. A esto se le suma el hecho de que el almacenamiento de los frutos de mandarina en dichos tratamientos fue continuo a 2°C, por tanto, se esperaba que la producción de etileno fuera más baja que en los frutos con calentamiento intermitente, y como consecuencia los



**Figura 3.** Delta de color en frutos de mandarina 'Arrayana' almacenados a 2°C con diferentes tratamientos térmicos. Inmersión con agua caliente en tratamientos de 5 y 3 min. CI: calentamiento intermitente. ns: sin diferencias estadísticas; \* diferencias estadísticas al 5%. Las barras indican error estándar.

cambios de color serán menores, tal como ocurrió con los frutos que fueron tratados con agua caliente durante 5 min a 50°C. Al respecto, Rodrigo *et al.* (2013) mencionan que el etileno está involucrado en el cambio de color de la epidermis de cítricos.

Además, es posible que las fluctuaciones de temperatura presentadas en los tratamientos de calentamiento intermitente sean necesarios para la síntesis y actividad de enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenoides y en la degradación de clorofilas, lo cual explicaría la mayor acumulación de carotenoides y la menor presencia de clorofilas en el tratamiento de calentamiento intermitente cada 8 d, así como el

**Tabla 2.** Parámetros de maduración de frutos de mandarina 'Arrayana' almacenados a 2°C.

Tratamientos térmicos	Clorofila total ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Carotenoides totales ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Firmeza (N)	Acidez total titulable (%)	Sólidos solubles totales (°Brix)
Testigo	0,10±0,01 a	715,14±70,39 b	19,62±1,27 b	0,67±0,13 b	11,98±0,87 a
5 min a 50°C	0,09±0,008 a	572,45±73,12 b	22,52±1,28 a	0,85±0,10 ab	11,35±0,46 a
3 min a 53°C	0,07±0,005 ab	760,93±64,91 b	23,08±1,11 a	0,98±0,22 a	13,25±0,17 a
CI/8d	0,05±0,02 b	976,60±52,88 a	18,98±0,67 b	0,68±0,08 b	11,25±0,68 a
CI/12d	0,06±0,006 b	744,87±66,27 b	19,16±0,95 b	0,63±0,10 b	11,28±1,08 a
Significancia	*	**	*	*	ns

ns: no hay diferencia estadística; \*\*diferencias estadísticas al 1%. Promedios con letras distintas en la misma columna, indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Inmersión con agua caliente en tratamientos de 5 y 3 min. CI: calentamiento intermitente.

mayor cambio de color de la epidermis (Tab. 2). Al respecto, Le Roux (2006) menciona la importancia de la fluctuación de la temperatura sobre el desarrollo del color en cítricos, y esta es una situación interesante para el proceso de comercialización, teniendo en cuenta que las mandarinas cultivadas en el trópico frecuentemente generan un pobre desarrollo del color, por lo que en muchos casos se opta por tratamientos de desverdizado con etileno (Rodrigo *et al.*, 2013), por esta razón, es importante indicar que los tratamientos de calentamiento intermitente se convierten en una alternativa favorable como técnica poscosecha en las mandarinas arrayanas.

### Firmeza

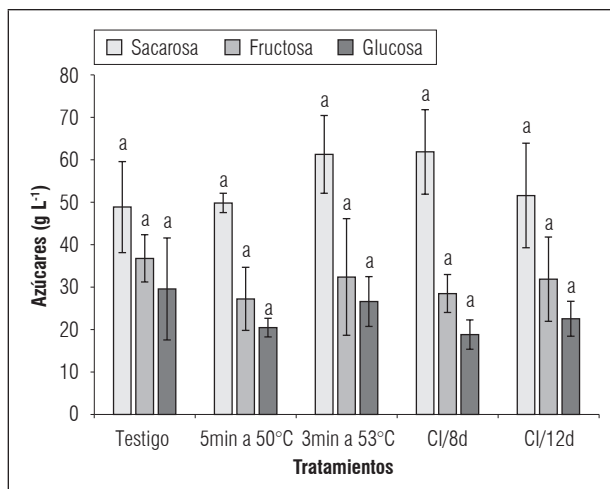
Con diferencias estadísticas ( $P \leq 0,05$ ), los frutos de mandarina de los tratamientos con agua caliente presentaron la mayor firmeza (Tab. 2). Estos resultados coinciden con lo encontrado en frutos de kiwi, donde la mayor firmeza se obtuvo con tratamientos térmicos de agua a 35 y 45°C (Ma *et al.*, 2014). Los tratamientos de calentamiento intermitente no afectaron la firmeza en relación a los frutos testigo, situación que difiere de lo encontrado en frutos de *Capsicum annuum* donde el calentamiento intermitente redujo

los daños por frío y mantuvo una mayor firmeza (Liu *et al.*, 2015).

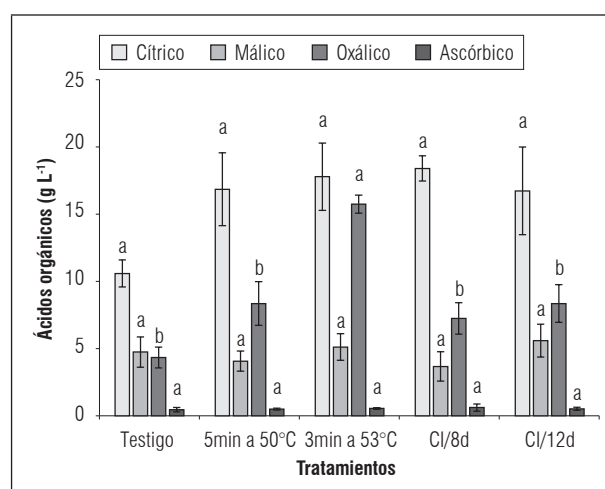
Varios estudios reportan que las altas temperaturas inhiben varias enzimas involucradas en el ablandamiento, por ejemplo, las enzimas  $\beta$ -mananasa y  $\alpha$  y  $\beta$ -galactosidasa en tomates (Sozzi *et al.*, 1997) y poligalacturonasa en mango (Ketsa *et al.*, 1998). Esto puede ser debido a que las altas temperaturas pueden generar cambios en la conformación de proteínas (Paliyath *et al.*, 2008), procesos que al parecer se presentaron en los frutos de mandarina sometidos a los tratamientos con agua caliente y explicarían la mayor firmeza en estos frutos.

### Azúcares y ácidos orgánicos

No se observaron diferencias significativas entre tratamientos, los SST oscilaron en promedio entre  $11,25 \pm 0,68$  y  $13,25 \pm 0,17$  °Brix (Tab. 2), asimismo, para sacarosa, glucosa y fructosa tampoco hubo diferencias estadísticas (Fig. 4). Para la acidez total titulable, se presentaron diferencias estadísticas ( $P \leq 0,05$ ), se encontró que los frutos sometidos a inmersión en agua caliente durante 3 min a 53°C presentaron mayor ATT, mientras que los frutos testigos tuvieron menor ATT (Tab. 2), para el ácido oxálico también



**Figura 4.** Contenido de azúcares solubles en frutos de mandarina 'Arrayana' almacenados a 2°C con diferentes tratamientos térmicos. Inmersión con agua caliente en tratamientos de 5 y 3 min. CI: calentamiento intermitente. Promedios con letras distintas en el tratamiento, indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Las barras indican error estándar.



**Figura 5.** Contenido de ácidos orgánicos en frutos de mandarina 'Arrayana' almacenados a 2°C con diferentes tratamientos térmicos. Inmersión con agua caliente en tratamientos de 5 y 3 min. CI: calentamiento intermitente. Promedios con letras distintas indican diferencia significativa entre el mismo ácido orgánico según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Las barras indican error estándar.

hubo diferencias estadísticas, donde el agua caliente a 53°C por 3 min generó mayor presencia de este ácido, los demás tratamientos tuvieron valores significativos más bajos. Los ácidos cítrico, málico y ascórbico no evidenciaron diferencias significativas (Fig. 5).

Varios autores reportan que los tratamientos con agua caliente incrementan los SST en frutos climatéricos (Liu *et al.*, 2015; Lara *et al.*, 2009), pero en los frutos de mandarina por su carácter no climatérico, es común que los parámetros relacionados con la madurez interna no cambien de manera representativa después de la cosecha, esto explicaría la no existencia de diferencias estadísticas en relación a los azúcares, a acidez y los ácidos orgánicos, excepto en el ácido oxálico. No obstante, Maldonado *et al.* (2004) indican que durante la refrigeración puede presentarse una disminución de los ácidos orgánicos, como indicativo de los cambios en el metabolismo energético, estabilidad del pH y compuestos de defensa que previenen o están implicados en la reparación de los daños causados por las bajas temperaturas, pero teniendo en cuenta que no hubo daños visibles por frío, incluso en los frutos testigo, se puede pensar que el metabolismo de los ácidos orgánicos pudo tener más implicación en los procesos propios de la maduración que en la respuesta a daños por frío en los diferentes tratamientos.

Por lo anterior, el mayor nivel de ácido oxálico en los frutos tratados con agua caliente a 53°C por 3 min puede estar asociado a cambios en la actividad enzimática del metabolismo de los ácidos orgánicos, o como intermediario metabólico en el proceso de maduración pero que no afecta la acidez total de los frutos. En concordancia, Ghasemnezhad *et al.* (2008) no observaron diferencias en la acidez de frutos de mandarina con tratamientos de agua caliente y Schirra *et al.* (2004) no encontraron efecto sobre los sólidos solubles totales, la acidez total titulable y el ácido ascórbico en frutos de naranja.

## CONCLUSIONES

No se presentaron síntomas de daños por frío visibles en los frutos de mandarina arrayana almacenados a 2°C durante 40 d. Al final del almacenamiento, los tratamientos térmicos utilizados no afectaron significativamente los azúcares, la ATT, los ácidos cítrico, málico y ascórbico ni los sólidos solubles totales, teniendo poco efecto sobre la madurez interna de los frutos de mandarina. El calentamiento intermitente se caracterizó por aumentar las pérdidas de peso de los

frutos, la tasa respiratoria pero generó mayor cambio de color de la epidermis al presentar mayor acumulación de carotenoides totales y una baja concentración de clorofilas, siendo este último, un resultado importante desde el punto de vista comercial porque las mandarinas arrayanas comúnmente presentan pobre desarrollo del color, además, es un resultado que deja abierta la posibilidad de seguir trabajando con el calentamiento intermitente pero con algunas modificaciones para lograr optimizarlo.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la “Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad el Bosque, Bogotá (Colombia), por la financiación de esta investigación a través del proyecto PCI-2015-8256.

**Conflicto de intereses:** el manuscrito fue preparado y revisado con la participación de los autores, quienes declaran no tener algún conflicto de interés que coloquen en riesgo la validez de los resultados aquí presentados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alegria, C., J. Pinheiro, M. Duthoit, E.M. Gonçalves, M. Moldão-Martins y M. Abreu. 2012. Fresh-cut carrot (cv. Nantes) quality as affected by abiotic stress (heat shock y UV-C irradiation) pretreatments. *Food Sci. Technol-Leb.* 48(2), 197-203. Doi: 10.1016/j.lwt.2012.03.013
- Artés, F. y F. Artés-Hernández. 2002. Daños por frío en la postcosección de frutas y hortalizas. pp. 299-310. En: López, A., A. Esnoz y F. Artés (eds.). *Avances en Ciencias y Técnicas del Frío-1*. Universidad Politécnica; Sociedad Española de Ciencias y Técnicas del Frío, Cartagena, España.
- Artés, F., P. Velasquez y J.G. Marin. 1998. Reduction of decay and chilling injuries in cold stored oranges. pp. 243-248. En: Bertolini, P., P.C. Sijmons, M.E. Guerzoni y F. Serra. (eds.). *Nom conventional methods for the control de postharvest disease and microbial spoilage*. Ed. European Commission, Bruselas, Bélgica.
- Balaguera, H.E. 2015. Comportamiento poscosecha del fruto de uchuva (*Physalis peruviana* L.): efecto del 1-metilciclopropeno y de refrigeración. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Balaguera-López, H.E., C.A. Martínez y A. Herrera. 2015. Refrigeration affects the postharvest behavior of 1-methylcyclopropenetrated cape gooseberry (*Physalis*

- peruviana* L.) fruits with the calyx. *Agron. Colomb.* 33(3), 356-364. Doi: 10.15446/agron.colomb.v33n3.51896
- Balaguera-López, H., M. Espinal-Ruiz, L. Zacarías y A. Herrera. 2016. Effect of ethylene and 1-methylcyclopropane on the postharvest behavior of cape gooseberry fruits (*Physalis peruviana* L.). *Food Sci. Technol. Int.* 23(1), 86-96 Doi: 10.1177/1082013216658581
- Bassal, M. y M. El-Hamahmy. 2011. Hot water dip and preconditioning treatments to reduce chilling injury and maintain postharvest quality of Navel and Valencia oranges during cold quarantine. *Postharvest Biol. Technol.* 60, 186-191. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2011.01.010
- Carvalho, C., P. Navarro y A. Salvador. 2012. Poscosecha. pp. 223-284. En: Garcés, L. y C. Pássaro (eds.). *Cítricos: cultivo, poscosecha e industrialización*. Editorial Artes y Letras, Itagüí, Colombia.
- Chaparro-Zambrano, H., H. Velásquez-Ramírez y J.O. Ordúz-Rodríguez. 2017. Evaluation of 'Arrayana' tangerine (*Citrus reticulata* Blanco) grafted onto different rootstocks in tropical lowlands of Colombian Orinoquia, 2005-2011 (second cycle). *Agron. Colomb.* 35(1), 29-34. Doi: 10.15446/agron.colomb.v35n1.60082
- Crisosto, C.H., B. Mitcham y M. Cantwell. 2008. Optimum temperature conditions for produce handlers. *Central Valley Postharvest Newsletter* No. 17 Cooperative Extension, University of California, Davis, CA, USA.
- Fallik, E. 2004. Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). *Postharvest Biol. Technol.* 32, 125-134. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2003.10.005
- Ghasemnezhad, M., K. Marsh, R. Shilton, M. Babalar y A. Wolf. 2008. Effect of hot water treatments on chilling injury and heat damage in 'satsuma' mandarins: Antioxidant enzymes and vacuolar ATPase, and pyrophosphatase. *Postharvest Biol. Technol.* 48, 364-371. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.09.014
- Hernández-Muñoz, P., E. Almenar, V. Del Valle, D. Vélez y R. Gavara. 2008. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chem.* 110, 428-435. Doi: 10.1016/j.foodchem.2008.02.020
- Holland, N., F.L. Nunes, I.U. de Medeiros y M.T. Lafuente. 2012. High-temperature conditioning induces chilling tolerance in mandarin fruit: a cell wall approach. *J. Sci. Food Agric.* 92, 3039-3045. Doi: 10.1002/jsfa.5721
- Hong, S., H. Lee y D. Kim. 2007. Effects of hot water treatment on the storage stability of Satsuma mandarin as a postharvest decay control. *Postharvest Biol. Technol.* 43, 271-279. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2006.09.008
- Kader, A.A. 2002. *Postharvest technology of horticultural crops*. 3<sup>rd</sup> ed. Division of Agriculture and Natural Resources, University of California, Oakland, CA, USA.
- Ketsa, S., S. Chidragool, J.D. Klein y S. Lurie. 1998. Effect of heat treatment on changes in softening, pectic substances and activities of polygalacturonase, pectinesterase and  $\beta$ -galactosidase of ripening mango. *J. Plant Physiol.* 153, 457-461. Doi: 10.1016/S0176-1617(98)80174-0
- Ladaniya, M. 2008. *Citrus fruit: biology technology and evaluation*. Elsevier, Atlanta, GA. Doi: 10.1016/B978-0-12-374130-1.X5001-3
- Lado, J., O. Cronje, M.J. Rodrigo y L. Zacarías. 2015. Resistance to chilling injury in red, lycopene-accumulating tissue of cold-stored grapefruits. *Acta Hort.* 1079, 249-256. Doi: 10.17660/ActaHortic.2015.1079.29
- Lafuente, M.T. y L. Zacarías. 2006. Postharvest physiological disorder in citrus fruit. *Stewart Postharvest Rev.* 2, 1-9. Doi: 10.2212/spr.2006.1.2
- Lara, M.V., J. Borsani, C.O. Budde, M.A. Lauxmann, V.A. Lombardo, R. Murray, C.S. Andreo y M.F. Drincovich. 2009. Biochemical and proteomic analysis of 'Dixiland' peach fruit (*Prunus persica*) upon heat treatment. *J. Exp. Bot.* 60, 4315-4333. Doi: 10.1093/jxb/erp267
- Le Roux, S. 2006. Preharvest manipulation of rind pigments of *Citrus spp.* Tesis de maestría. Department Horticultural Sciences, University of Stellenbosch, Stellenbosch, Sudáfrica.
- Liu, L., Y. Wei, F. Shi, C. Liu, X. Liu y S. Ji. 2015. Intermittent warming improves postharvest quality of bell peppers and reduces chilling injury. *Postharvest Biol. Technol.* 101, 18-25. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2014.11.006
- Lurie, S., A. Handros, E. Fallik y R. Shapira. 1996. Reversible inhibition of tomato fruit gene expression at high temperature. *Plant Physiol.* 110, 1207-1214.
- Ma, Q., S. Jiangtao, D. Huber, X. Dong, Y. Han, Z. Zhang y J. Rao. 2014. Effect of hot water treatments on chilling injury and expression of a new C-repeat binding factor (CBF) in 'Hongyang' kiwifruit during low temperature storage. *Postharvest Biol. Technol.* 97, 102-110. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2014.05.018
- Maldonado, R.M., M.T. Sánchez-Ballesta, R. Alique, I. Escribano y C. Merodio. 2004. Malate metabolism and adaptation to chilling temperature storage by pretreatment with high CO<sub>2</sub> levels in *Annona cherimola* fruit. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4758-4763. Doi: 10.1021/jf0353842
- Mendoza, F., P. Dejmek y J.M. Aguilera. 2006. Calibrated color measurements of agricultural foods using image analysis. *Postharvest Biol. Technol.* 41, 285-295. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2006.04.004
- Ordúz-Rodríguez, J.O., J. Monroy, S. Barrera, V. Núñez y G.A. Ligarreto. 2012. Caracterización morfo-agronómica y molecular de mandarina 'Arrayana' en el piedemonte del Meta (Colombia). *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.* 13, 5-12. Doi: 10.21930/rcta.vol13\_num1\_art:234



- Paliyath, G., D.P. Murr, A.K. Handa y S. Lurie. 2008. Postharvest biology and technology of fruits, vegetables, and flowers. Wiley-Blackwell Publishing, Nueva Delhi, India.
- Pereira, D., M. Rodrigues, J. Da Costa, R. Pires, Y. Bruckner y C. Horst. 2013. Cold storage of peaches cv. Aurora grown in the Zona da Mata Mineira, Minas Gerais State, Brazil. *Rev. Ceres* 60(6), 833-841. Doi: 10.1590/S0034-737X2013000600012
- Rodrigo, M., B. Alquézar, E. Alós, J. Lado y L. Zacarías. 2013. Biochemical bases and molecular regulation of pigmentation in the peel of Citrus fruit. *Sci. Hortic.* 163, 46-62. Doi: 10.1016/j.scienta.2013.08.014
- Rozenzweig, D., C. Elmaci, A. Samach, S. Lurie y R. Porat. 2004. Isolation of four heat shock protein cDNAs from grapefruit peel tissue and characterization of their expression in response to heat and chilling temperature stresses. *Physiol. Plant.* 121, 421-428. Doi: 10.1111/j.1399-3054.2004.00334.x
- Sala, J.M. y M.T. Lafuente. 2000. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. *Postharvest Biol. Technol.* 20, 81-89. Doi: 10.1016/S0925-5214(00)00115-0
- Schirra, M. y E. Cohen. 1999. Long-term storage of 'Olanda' oranges under chilling and intermittent warming temperatures. *Postharvest Biol. Technol.* 16, 63-69. Doi: 10.1016/S0925-5214(98)00097-0
- Schirra, M., M. Mulas, A. Fadda y E. Cauli, 2004. Cold quarantine responses of blood oranges to postharvest hot water and hot air treatments. *Postharvest Biol. Technol.* 31, 191-200. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2003.09.002
- Shadmani, N., S.H. Ahmad, N. Saari, P. Ding y N.E. Tajidin. 2015. Chilling injury incidence and antioxidant enzyme activities of *Carica papaya* L. 'Frangi' as influenced by postharvest hot water treatment and storage temperature. *Postharvest Biol. Technol.* 99, 114-119. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2014.08.004
- Sozzi, G.O., O. Cascone y A.A. Frascina. 1997. Effect of high temperature stress on endo- $\beta$ -mannanase and  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidase activities during tomato fruit ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 9, 49-63. Doi: 10.1016/0925-5214(96)00014-2

# Carotenoides, clorofilas y pectinas durante la maduración de variedades de guayaba (*Psidium guajava* L.) de Santander, Colombia

Carotenoids, chlorophylls and pectins during ripening of guava (*Psidium guajava* L.) from Santander, Colombia



JACQUELINE GUAVITA-VARGAS<sup>1</sup>  
LIZETH M. AVELLANEDA-TORRES<sup>1, 2</sup>  
MARÍA ELENA SOLARTE<sup>1, 3</sup>  
LUZ MARINA MELGAREJO<sup>1, 4</sup>

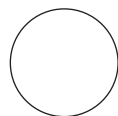
**Fruto de guayaba 'Ráquira Blanca'.**

Foto: M.E. Solarte

## RESUMEN

Se evaluó el contenido de carotenoides, clorofila y pectinas en frutos de guayaba *Psidium guajava* L. en tres localidades del departamento de Santander, Colombia (Barbosa, Puente Nacional y Vélez), en cuatro variedades (Regional Blanca, Ráquira Blanca, Guavatá Victoria y Regional Roja) y en cuatro estados de madurez (verde, madurez fisiológica, pintón y maduro). Los contenidos de carotenoides y clorofilas totales fueron determinados por espectrofotometría en endocarpo y exocarpo. Los contenidos de pectina se determinaron por el método gravimétrico. Los resultados fueron estadísticamente significativos ( $P \leq 0,05$ ), obteniendo los mayores contenidos de carotenoides en la variedad Regional Roja (166,3 mg/100 g, estado pintón, en Barbosa), de clorofila en Guavatá Victoria (39,87 mg/100 g, estado verde, en Vélez) y de pectinas en Regional Blanca (1,79% p/p, estado madurez fisiológica, en Puente Nacional). Las variedades de pulpa blanca (Regional Blanca, Ráquira Blanca y Guavatá Victoria) presentaron mayores contenidos de carotenoides en el exocarpo (11,19 mg/100 g), a diferencia de la variedad Regional Roja cuyo contenido fue mayor en endocarpo (13,06 mg/100 g). Los análisis de componentes principales (ACP) y análisis de conglomerado jerárquico, evidenciaron una relación directa entre carotenoides, clorofila y pectinas en las variedades de pulpa blanca (Regional Blanca, Ráquira Blanca y Guavatá Victoria); a diferencia de la relación inversa encontrada en la variedad Regional Roja.

**Palabras clave adicionales:** pigmentos, frutas, pulpa, exocarpo, endocarpo.



<sup>1</sup> Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (Colombia). ORCID Guavita-Vargas, J.: 0000-0002-0714-2306; ORCID Melgarejo, L.M.: 0000-0003-3148-1911

<sup>2</sup> Facultad de Ingeniería, Grupo de Investigación Tecnambiental, Universidad Libre de Colombia, Bogotá (Colombia). ORCID Avellaneda-Torres, L.M.: 0000-0002-8520-9123

<sup>3</sup> Departamento de Biología, Universidad de Nariño, San Juan de Pasto (Colombia). ORCID Solarte, M.E.: 0000-0001-5349-1374

<sup>4</sup> Autor para correspondencia. [lmelgarejom@unal.edu.co](mailto:lmelgarejom@unal.edu.co)



## ABSTRACT

We evaluated the contents of carotenoids, chlorophyll and pectin in guava fruit, *Psidium guajava* L., in three locations (Barbosa, Puente Nacional, and Vélez) in Santander Department, Colombia in four varieties (Regional Blanca, Raquira Blanca, Guavata Victoria, Regional Roja) for four stages of maturity (green, physiological maturity, semi-ripe, ripe). The total carotenoids and chlorophyll were determined with spectrophotometry, differentiating the endocarp, exocarp and pectins using the gravimetric method. The results were statistically significant ( $P \leq 0.05$ ), obtaining the highest contents of carotenoids in the variety Regional Roja (166.3 mg/100 g, semi-ripe state in Barbosa), the highest chlorophyll in Guavata Victoria (39.87 mg/100 g, green state in Vélez) and the highest pectins in Regional Blanca (1.79% p/p, physiological maturity state, in Puente Nacional). The white fleshed varieties (Regional Blanca, Raquira Blanca and Guavata Victoria) had higher contents of carotenoids in the exocarp (11.19 mg/100 g), unlike the Regional Roja variety, which had a high content in the endocarp (13.06 mg/100 g). The principal component analysis (PCA) and cluster analysis showed a direct relationship between the carotenoids, chlorophyll and pectin in white-fleshed varieties, in contrast to the inverse relationship found in the Regional Roja variety.

**Additional key words:** pigments, fruits, pulp, exocarp, endocarp.

Fecha de recepción: 05-02-2018 Aprobado para publicación: 30-05-2018

## INTRODUCCIÓN

La guayaba (*Psidium guajava* L.) es comercialmente cultivada en varios países tropicales y subtropicales del mundo. Colombia junto a otros países es productor del fruto, el cual es muy nutritivo y de buen sabor, caracterizado por un alto contenido de pectina, fibra dietaria, minerales, vitaminas principalmente la C, aminoácidos esenciales y con alto potencial antioxidante (Vasconcelos *et al.*, 2017); además, presenta diferentes características farmacológicas, y es bajo en calorías (Singh, 2011; González *et al.*, 2011). Es fácilmente disponible y nombrada como “manzana de trópicos” y “super fruta” por sus ricos valores nutraceuticos (Maji *et al.*, 2015).

En Colombia, la más amplia producción está localizada en la región noreste del País, región que produce tradicionalmente dos variedades, conocidas como “Regional Roja” (pulpa rosada) y “Regional Blanca” (pulpa blanca), que se consumen principalmente. A medida que la guayaba madura, el color de la piel (exocarpo) cambia de verde a verde claro o amarillo. La pulpa (endocarpo) de la fruta puede ser blanca, amarilla, rosada o roja, dependiendo de la variedad. Se puede consumir entera o cocinada y la mayor parte de la cosecha es procesada como jalea, sorbete, pasta o puré (Steinhaus *et al.*, 2008; González *et al.*, 2011).

Esta fruta también es rica en sustancias pécticas (García-Betanzos *et al.*, 2017), las cuales son utilizadas en

la industria alimentaria, farmacéutica, del papel, en preparación de películas biodegradables, en metalurgia, y como antioxidante sanguíneo, entre otras aplicaciones (Ferreira, 2007).

El presente estudio aporta a la evaluación de los contenidos de carotenoides, clorofila y pectinas en guayabas regionales de Colombia, que son consumidas tradicionalmente en el país y de las cuales es importante conocer sus componentes para aprovecharlos en alimento, salud y agroindustria; debido a esto, se abordan fuentes de variación como variedad vegetal, localidades de colecta, estados de madurez del fruto y tejidos del fruto (exocarpo y endocarpo). Por tal razón, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el contenido de carotenoides, clorofilas y pectinas en cuatro variedades regionales de guayaba durante la maduración del fruto, en tres localidades del departamento de Santander, Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron muestras de guayaba provenientes de tres localidades del departamento de Santander (Colombia): Barbosa ubicada a 1.570 msnm, 5°56'36" N y 73°36'46" W; Puente Nacional a 1.720 msnm, 5°57'04" N y 73°41'07" W; Vélez a 1.890 msnm, 5°57'03" N y 73°39'45" W. Se evaluaron tres variedades de pulpa

blanca: Regional Blanca, Ráquira Blanca y Guavatá Victoria, y una variedad de pulpa roja: Regional Roja. Se evaluaron en cuatro estados de madurez, teniendo en cuenta la edad (días después de la floración; ddf). Los frutos fueron recolectados de la parte media del dosel de los árboles ( $n=4$ ) por variedad, así: verde, 90-120 ddf; madurez fisiológica, 121-140 ddf; pintón, 141-159 ddf; y maduro, 160-170 ddf (Solarte *et al.*, 2014). En cada uno de los estados se determinó en exocarpo (cáscara) y endocarpo (pulpa) los contenidos de clorofilas y carotenoides; mientras que pectinas se determinó sin diferenciar tejido vegetal.

La selección de los frutos a analizar se basó en el color del exocarpo, la firmeza del mismo, y las propiedades químicas como pH, sólidos solubles y acidez total titulable, de acuerdo a la metodología reportada por Cantillo *et al.* (2011). Se tuvieron en cuenta los criterios descritos anteriormente para la clasificación de los frutos, siguiendo específicamente las tablas de calidad reportadas por Solarte *et al.* (2010a). Las mediciones se realizaron por triplicado teniendo en cuenta todas las fuentes de variación (localidad, variedad, estado de madurez y tejido vegetal); sin embargo, por problemas de exceso de lluvias, plagas, enfermedades, aborto de flores y frutos, o por muy baja producción no se pudieron tomar algunas muestras, lo cual impidió realizar análisis adicionales para separar las medias por significancia estadística entre los estados de maduración, inherentes a cada variedad en cada localidad.

### Determinación de pectinas

Se determinaron pectinas por el método gravimétrico con hexametafosfato de sodio (Ferreira, 2007), con las siguientes modificaciones: se tomaron tres frutos por estado de madurez, se pesaron 10 g y se agregaron 25 mL de solución ( $\text{NaPO}_3$ )<sub>6</sub> según las indicaciones de Ferreira (2007). Se ajustó el pH a 4,5 con HCl 10%v/v. El contenido de pectinas se expresó en % p/p.

### Determinación de clorofila y carotenoides totales

Las determinaciones de clorofila y carotenoides totales se realizaron con base en lo descrito por Lichtenthaler (1987) y Melgarejo (2010). Las muestras fueron liofilizadas y posteriormente se pesaron 0,09 g de tejido vegetal para los respectivos análisis. El contenido de clorofilas y carotenoides totales se expresó de acuerdo con el porcentaje de peso seco en mg/100 g. Todos los reactivos fueron grado analítico Sigma.

### Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad, siguiendo el test Shapiro-Wilk y Bartlett (De la Garza *et al.*, 2013), respectivamente. Se realizó la prueba de Kruskal Wallis para evaluar el efecto de los factores variedad, localidad, estado de maduración y sus interacciones en los cambios del contenido de clorofilas, carotenoides y pectinas utilizando el programa R versión libre 2.10.0<sup>®</sup> 2009 (The R Foundation for Statistical Computing) aplicando pruebas como Kruskal y Wilcoxon). Se aplicaron herramientas de análisis multivariado de datos como el Análisis de Componentes Principales (ACP) para analizar las variables estudiadas y su correlación con los componentes (localidad, variedad, estado de maduración) determinados para este trabajo. Se realizó análisis de conglomerado jerárquico para el agrupamiento de los datos utilizando el programa Spad (2010) v. 7 con el método de WARD, que usa la variación de las distancias euclidianas de los datos de los componentes de ACP realizado anteriormente. Se identificaron grupos y se validaron y consolidaron con el método de K-means (De la Garza *et al.*, 2013).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Kruskal Wallis mostró que hubo diferencias estadísticas significativas entre los factores principales: localidad, variedad, estados de maduración y la interacción entre estos (Tab. 1). Los mayores contenidos

**Tabla 1. Valores de P. Prueba de Kruskal Wallis para los contenidos de clorofila, carotenoides y pectinas de guayaba según localidad de colecta, variedad y grado de madurez.**

Fuente de variación	Clorofila		Carotenoides		Pectinas	
	df	P-valor	df	P-valor	df	P-valor
Variedad	2	***	3	***	3	***
Madurez	3	***	3	***	3	***
Localidad	2	***	2	***	2	***
Variedad	3	***	3	***	3	***
Localidad	2	***	2	***	1	***
Madurez	3	***	3	***	2	***
Localidad*madurez	5	***	5	***	2	***
Localidad*variedad	5	***	9	***	5	***
Variedad*madurez	5	***	5	***	5	***

Valores de  $P \leq 0,05$ ;  $n=3$ ; df: grados de libertad.

de pectina de las guayabas regionales colombianas se presentaron en la localidad de Vélez, en estado de madurez fisiológica (1,69% p/p en 'Regional Blanca' y 1,72% p/p en 'Regional Roja'), y en Puente Nacional para el mismo estado de madurez (1,79% p/p en 'Regional Blanca') (Tab. 2). Estos resultados fueron mayores con respecto a lo reportado en otros estudios

como la guayaba cv. Banarsi Surkha (Jain *et al.*, 2003), la guayaba de Brasil (0,75-0,92% p/p) (Fischer *et al.*, 2012) y la guayaba 'Regional Roja' de Puente Nacional (1,52% en puré) (Osorio *et al.*, 2011). Por otro lado, en la variedad Regional Blanca proveniente de Barbosa aumentó el contenido de pectina durante la maduración del fruto, a diferencia de las variedades

**Tabla 2. Contenidos de pectinas, carotenoides totales y clorofila total en variedades de guayaba, en cuatro estados de maduración, proveniente de tres localidades de Colombia.**

Localidad	Variedad	Estado de maduración	Clorofila total (mg/100 g)	Carotenoides totales (mg/100 g)	Pectinas (%p/p)
Barbosa 1.570 msnm	Regional Blanca	Verde	56,67±1,13	15,17±0,27	0,86±0,03
		Madurez fisiológica	39,27±0,33	10,40±0,14	ND
		Pintón	25,34±0,25	6,990±0,18	0,90±0,01
		Maduro	22,01±0,52	24,52±0,53	1,06±0,01
	Ráquira Blanca	Verde	33,60±0,48	10,29±0,10	1,03±0,01
		Madurez fisiológica	29,31±0,62	8,398±0,24	0,78±0,01
		Pintón	40,29±0,46	7,495±0,23	1,16±0,01
		Maduro	11,32±0,21	4,988±0,20	0,81±0,03
	Roja	Verde	58,12±0,25	19,49±0,10	1,53±0,01
		Madurez fisiológica	141,1±2,94	26,81±0,49	1,29±0,01
		Pintón	166,3±0,99	9,119±0,12	1,04±0,02
		Maduro	23,32±0,63	23,71±0,26	0,88±0,01
	Guavatá Victoria	Verde	100,3±0,73	15,62±0,11	ND
		Madurez fisiológica	40,78±0,43	4,743±0,08	0,88±0,01
		Pintón	46,14±0,17	10,50±0,08	0,86±0,02
		Maduro	59,42±0,42	4,006±0,13	1,47±0,02
Puente Nacional 1.720 msnm	Blanca	Verde	84,85±1,18	15,89±0,26	0,51±0,009
		Madurez fisiológica	83,4±0,6	17,38±0,27	1,79±0,005
		Pintón	74,29±1,15	13,93±0,18	1,21±0,002
		Maduro	12,99±0,16	8,071±0,23	1,13±0,009
	Ráquira Blanca	Verde	68,78±0,64	9,630±0,33	ND
		Madurez fisiológica	57,89±0,26	11,66±0,23	0,89±0,01
		Pintón	89,44±0,76	12,83±0,26	ND
		Maduro	23,18±0,39	6,843±0,09	0,70±0,02
	Roja	Verde	84,92±0,10	25,20±0,45	1,05±0,04
		Madurez fisiológica	42,19±0,63	16,31±0,29	1,04±0,03
		Pintón	72,93±1,67	39,44±1,78	0,99±0,01
		Maduro	20,46±0,33	26,87±0,88	0,88±0,02
	Guavatá Victoria	Verde	66,32±0,59	28,55±0,38	ND
		Madurez fisiológica	107,8±0,88	20,15±0,36	0,89±0,01
		Pintón	66,96±0,22	13,52±0,14	0,68±0,03
		Maduro	21,36±0,20	6,883±0,15	0,51±0,007



Continuación Tabla 2.

Localidad	Variiedad	Estado de maduración	Clorofila total (mg/100 g)	Carotenoides totales (mg/100 g)	Pectinas (%p/p)
Vélez 1.890 msnm	Blanca	Verde	70,13±0,40	19,82±0,04	1,36±0,006
		Madurez fisiológica	120,1±0,94	24,82±0,20	1,69±0,005
		Pintón	27,59±0,18	10,10±0,15	0,97±0,03
		Maduro	31,70±0,58	11,69±0,31	0,85±0,01
	Ráquira Blanca	Verde	132,6±0,60	27,63±0,17	0,96±0,02
		Madurez fisiológica	125,8±0,47	18,34±0,34	1,51±0,009
		Pintón	73,23±0,27	15,31±0,15	1,11±0,01
		Maduro	53,65±0,19	10,91±0,12	1,30±0,03
	Roja	Verde	126,3±0,20	6,855±0,23	1,18±0,003
		Madurez fisiológica	90,78±1,0	22,86±0,23	1,72±0,008
		Pintón	85,75±0,23	26,69±0,05	1,24±0,03
		Maduro	28,19±0,20	38,72±0,67	0,73±0,01
	Guavatá Victoria	Verde	161,5±0,88	39,87±0,95	1,19±0,002
		Madurez fisiológica	ND	ND	1,20 ± 0,01
		Pintón	43,08±0,15	12,72±0,07	0,56±0,007
		Maduro	36,64±0,43	14,92±0,04	0,84±0,02

*n*=3; ND: no detectado.

Guavatá Victoria, Ráquira Blanca y Regional Roja de Puente Nacional y de Barbosa solamente en 'Regional Roja' (Tab. 2); lo que posiblemente se relaciona con la conversión enzimática entre las sustancias pécticas que pueden ser las responsables del incremento o disminución de diferentes fracciones pécticas (Das y Majumder, 2010). El aumento en el contenido de pectina durante el período de madurez fue reportado para guayaba 'Kampuchea' de Malasia, sugiriendo que ésta se sintetiza continuamente a lo largo del desarrollo del fruto (Ali *et al.*, 2004).

El contenido de carotenoides totales (exocarpo + endocarpo) fue mayor en las variedades Guavatá Victoria y Regional Roja (Tab. 2), los cuales fueron superiores ( $P \leq 0,05$ ) a los reportados para guayaba 'Red guava' y 'Yellow guava' cultivadas en Panamá (Murillo *et al.*, 2010) y a los contenidos obtenidos por Stinco *et al.* (2014). Sin embargo, para variedades como Guavatá Victoria y Regional Blanca, utilizando una técnica diferente no se encontraron carotenoides en una cantidad detectable (Sinuco *et al.*, 2010). Se ha reportado que la presencia de carotenoides y clorofilas caracterizan principalmente el color de la guayaba (González *et al.*, 2011) y que el color de la cáscara y pulpa de la fruta varía según el tipo y la cantidad de pigmentos (Flores *et al.*, 2015), por lo que la USDA

destacó el contenido de licopeno en 5,2 mg por 100 g de guayaba fresca (Singh, 2011). En guayaba roja de Brasil se reportó 330  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  ( $\beta$ -caroteno) y 6.150  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  (licopeno) en peso fresco (Vargas-Murga *et al.*, 2016). En 'Ráquira Blanca' de las localidades Barbosa y Vélez, y en Guavatá Victoria de Puente Nacional los contenidos de carotenoides totales presentaron tendencia a disminuir con la madurez del fruto (Tab. 2), lo que posiblemente esté relacionado con el color característico de estas variedades de pulpa blanca (Sinuco *et al.*, 2010). A diferencia de lo que ocurre con variedades colombianas como la 'Regional Roja' y la 'Palmira ICA-1', que aumentaron el contenido de carotenoides a medida avanzaron en los estados de maduración, específicamente en licopeno para 'Regional Roja' (7,30 mg  $\text{kg}^{-1}$  de fruta, estado I; 10,19 mg  $\text{kg}^{-1}$  de fruta, estado II; y 18,25 mg  $\text{kg}^{-1}$  de fruta, estado III) y 'Palmira ICA-1' (15,27 mg  $\text{kg}^{-1}$  de fruta, estado I; 23,18 mg  $\text{kg}^{-1}$  de fruta, estado II; y 28,07 mg  $\text{kg}^{-1}$  de fruta, estado III) (González *et al.*, 2011).

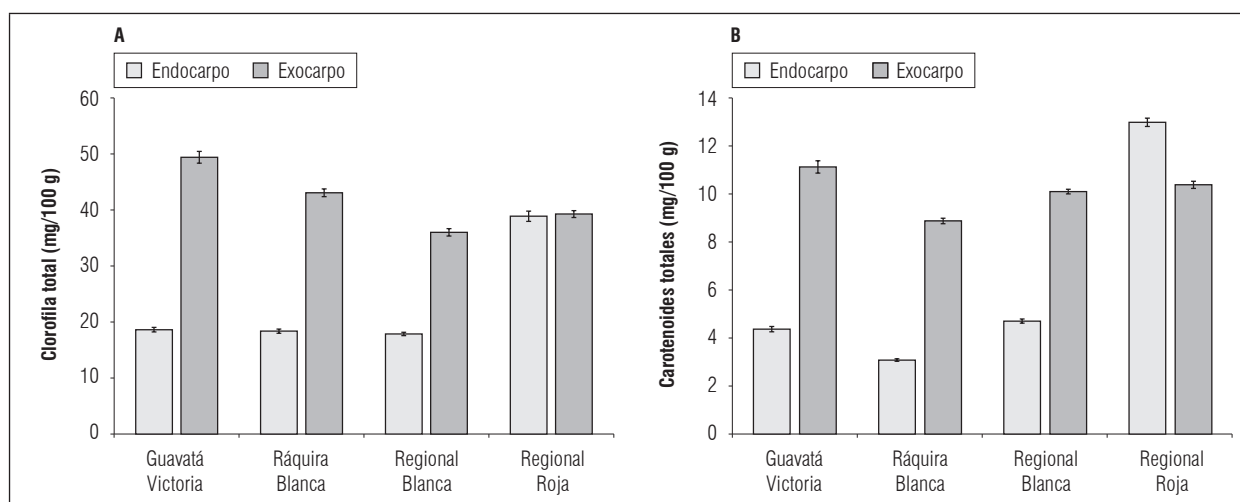
El contenido de clorofila total en fruto fue mayor en estado pintón para la variedad Regional Roja colectada en Barbosa (Tab. 2), valor mayor al obtenido por Stinco *et al.* (2014) con 40,67  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Por otra parte, la variedad Regional Blanca de las localidades Barbosa y Puente Nacional, y las variedades Guavatá Victoria,

Ráquira Blanca y Regional Roja de la localidad de Vélez, presentaron tendencia a disminuir el contenido de clorofila total con la madurez, por lo que al final de la maduración disminuyó la presencia de clorofilas, coincidiendo esta tendencia con lo encontrado para la variedad vietnamesa (Fischer *et al.*, 2012). No obstante, se ha reportado en guayaba 'Palмира ICA-1' en estado maduro, presencia de clorofilas lo que sugiere que puede haber retención de clorofilas, siendo común encontrarlas en guayabas de cáscara verde y pulpa intensa rosada (González *et al.*, 2011).

En la figura 1 se observa que las variedades de pulpa blanca Guavatá Victoria, Ráquira Blanca y Regional Blanca presentaron mayor contenido de carotenoides totales en el exocarpo (cáscara) con respecto al endocarpo (pulpa), lo que coincide con mayores contenidos de carotenoides en el exocarpo de las frutas (Hulme, 1970). Sin embargo, la variedad Regional Roja presentó un comportamiento contrario, lo que puede estar relacionado con el color rojo de la pulpa, donde los carotenoides que contribuyen a su color aumentan durante la maduración de la guayaba, siendo el licopeno el principal pigmento carotenoides en guayabas de pulpa roja, además de la presencia de  $\beta$ -caroteno (Singh, 2011). Algunos autores reportan que los colores rojo y amarillo en cáscara y pulpa de frutas son debidos a la presencia de carotenoides (Witsutiamonkul *et al.*, 2015).

En cuanto al contenido de clorofila total fue mayor en el exocarpo con respecto al endocarpo en todas las

variedades de pulpa blanca (Fig. 1), probablemente por la composición del exocarpo que está formado por células parenquimáticas que contienen cloroplastos y pigmentos (Flores-Vindas, 1999); a diferencia del resultado observado en la variedad Regional Roja con un contenido similar en los dos tejidos, lo que muestra un comportamiento distinto a las otras tres variedades de pulpa blanca. Las diferencias de los contenidos de clorofilas en el endocarpo y exocarpo de las variedades de guayaba evaluadas en el presente trabajo podrían estar relacionadas con las características de color descritas. Se ha reportado que en las variedades Regional Roja y Regional Blanca hay diferencias apreciables en el tono tanto de la pulpa como de la cáscara lo que podría ser un parámetro útil para la diferencia rápida entre las variedades de guayaba (González *et al.*, 2011). Por otra parte, se observó relación directa entre carotenoides totales, clorofila total y pectinas (Fig. 2), donde se evidencia mayor relación entre pectinas y clorofila total (0,43), lo que posiblemente esté asociado a la clorofila degradada por la acción de enzimas como la clorofilasa, clorofila oxidasa y peroxidasa. Los cambios en la pigmentación facilitan la discriminación visual de las frutas en los estados de maduración, y los cambios de textura son cruciales ya que afectan la vida útil de las frutas donde el contenido de pectina disminuye a lo largo de la maduración (Jain *et al.*, 2003; Matile y Hörtensteiner, 1999). Igualmente, en los estados de madurez verde y madurez fisiológica hay mayores contenidos de pectinas y clorofilas, lo cual coincide con el comportamiento y contenidos de estas dos variables en estados de menor madurez



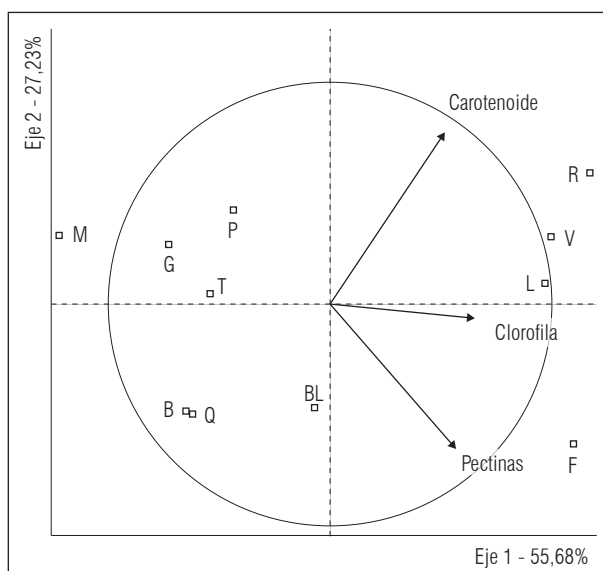
**Figura 1. Clorofila total (A) y carotenoides totales (B) en endocarpo y exocarpo para variedades de guayaba. Promedio de tres localidades (Puente Nacional, Barbosa y Vélez) y cuatro estados de maduración (verde, madurez fisiológica, pintón y maduro).  $n=3$  para cada factor. Las barras de error indican error estándar.**

de las frutas, como anteriormente se ha mencionado. La variedad Regional Roja es la que presenta mayor contenido de carotenoides respecto a las demás, lo que posiblemente esté relacionado con el color de su pulpa. La maduración de los frutos de guayaba se caracteriza por el ablandamiento de la pulpa, el cual está asociado a modificaciones químicas estructurales de la pectina (Abu-Goukh y Bashir, 2003). Dichas modificaciones se reporta ocurren durante la maduración de las frutas (Gwanpua *et al.*, 2014), el cual está acompañado de la solubilización de pectina y la acción de enzimas como pectinesterasa, poligalacturonasa y pectato liasas (Abu-Goukh y Bashir, 2003). El contenido total de pectina, generalmente, incrementa al inicio y luego disminuye en estado sobremaduro (Singh, 2011), por lo que opcionalmente, la madurez de muchos frutos puede medirse indirectamente con la firmeza del fruto, un índice inversamente proporcional a la madurez. Así que, la firmeza puede usarse como un índice de madurez en la clasificación y selección de las frutas (Cheng-Chang y Ching-Hua, 2014). Además, se ha reportado que existe una alta correlación entre el incremento de la actividad enzimática y la pérdida de firmeza en la pulpa de las frutas (Abu-Goukh y Bashir, 2003) y específicamente la firmeza se

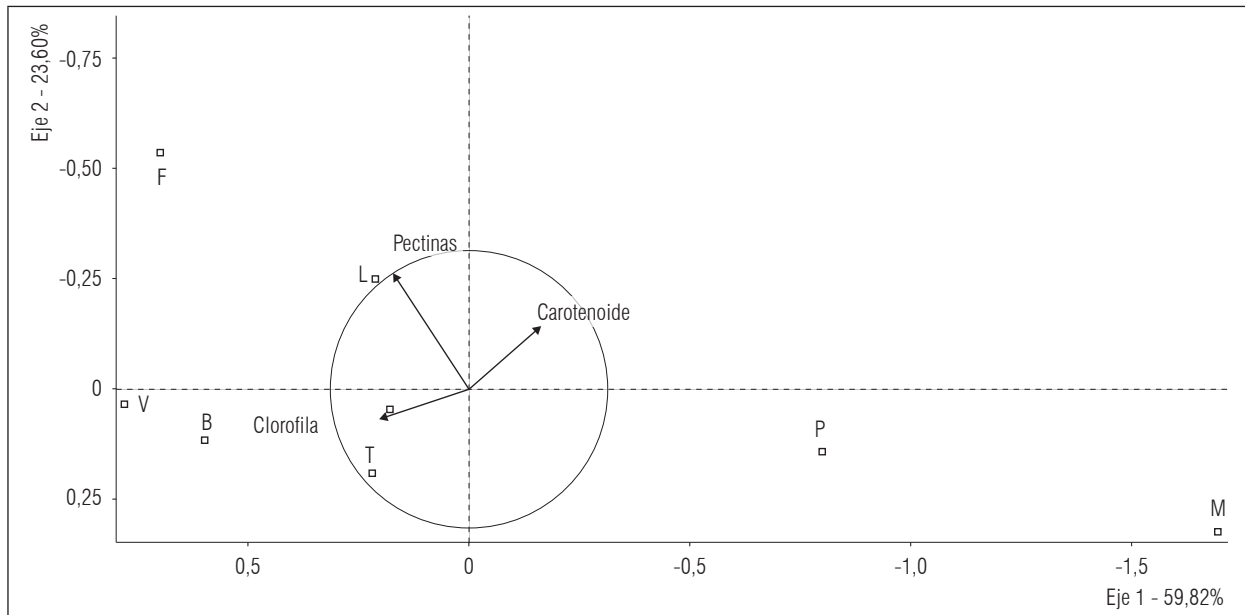
ha asociado con la cantidad de pectina presente (Lima *et al.*, 2010).

En la figura 2 también se observa que los frutos de la localidad de Vélez en su mayoría presentaron mayor contenido de clorofilas, carotenoides y pectinas, comparado con las demás localidades. En Vélez, la producción es tardía y el crecimiento del fruto hasta madurez fisiológica demora más tiempo (Solarte *et al.*, 2010b), lo que posiblemente esté evidenciando mejor adaptabilidad de la fruta a ésta región; porque tanto las épocas climáticas como las condiciones ambientales pueden tener considerable influencia sobre la maduración y calidad de la guayaba, adaptándose a diferentes condiciones de clima y suelo (Fischer *et al.*, 2012).

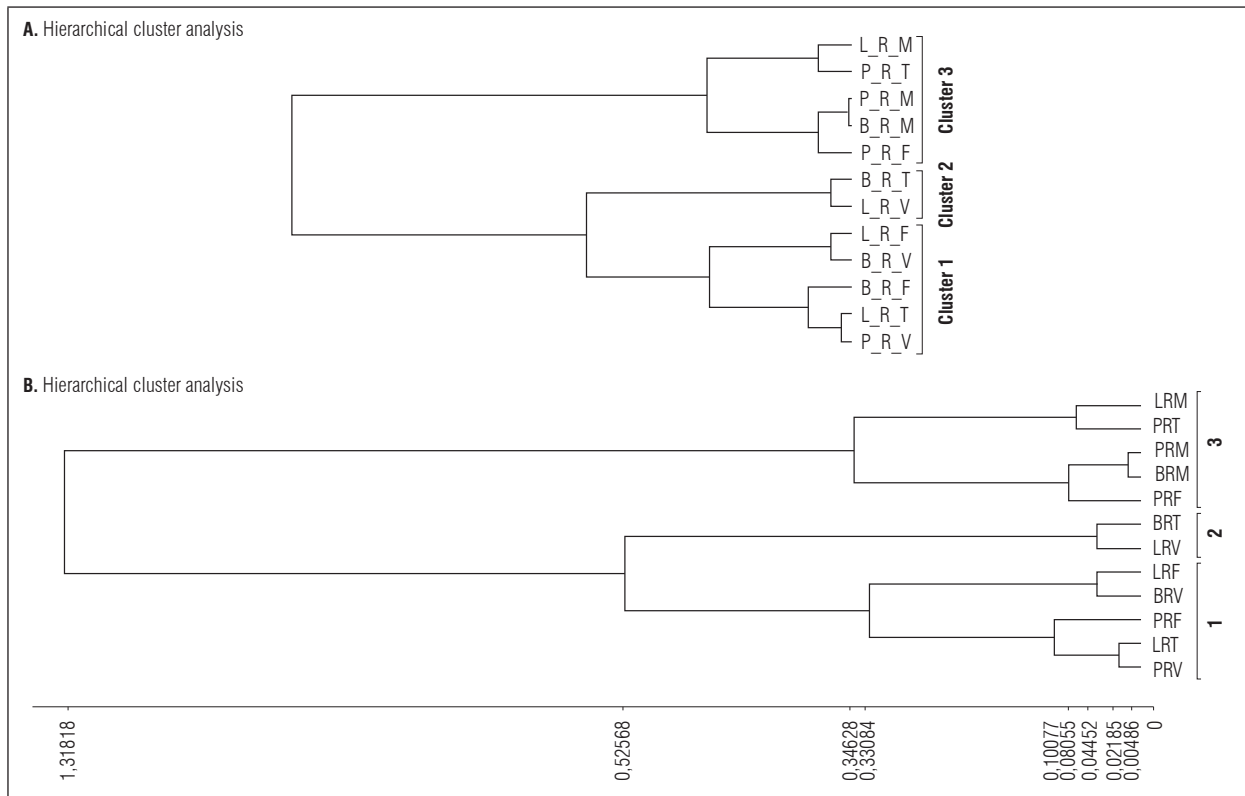
De acuerdo con los resultados y teniendo en cuenta la diferencia encontrada entre los contenidos de carotenoides y clorofilas para la variedad Regional Roja respecto a las demás variedades de pulpa blanca, se analizó por separado la variedad Regional Roja (Fig. 3). Se encontró una relación inversa entre el contenido de carotenoides y clorofilas, lo que sugiere que durante la maduración la cantidad de clorofila en los tejidos de la fruta disminuye rápidamente y la cantidad de carotenoides aumenta (Ayour *et al.*, 2016). Las clorofilas y carotenoides son sintetizados y acumulados en organelos especializados (cloroplastos y cromoplastos, respectivamente) (Matile y Hörtensteiner, 1999; Delgado-Pelayo *et al.*, 2014). El cambio causado por la síntesis de carotenoides y la degradación de clorofilas es el primer signo observable de maduración (Ayour *et al.*, 2016). El análisis de conglomerado jerárquico de los datos obtenidos para la variedad Regional Roja mostró tres grupos según los contenidos de carotenoides totales, clorofila total y pectinas (Fig. 4), teniendo en cuenta la localidad, la variedad y el estado de maduración como fuentes de variación. Así: el clúster tres indicó mayor contenido de carotenoides totales, en su mayoría muestras en estado maduro, de la localidad de Puente Nacional; el clúster dos indicó mayor contenido de clorofila total; y el clúster uno indicó mayor contenido de pectina, en su mayoría muestras en estado verde o madurez fisiológica de las localidades de Barbosa y Vélez. Dichos resultados pueden estar relacionados con el desarrollo del color característico de la fruta, lo cual ocurre una vez se alcanza la etapa de madurez fisiológica (García-Betanzos *et al.*, 2017); o por factores climáticos como la temperatura, con valores registrados de temperaturas máximas en Puente Nacional más altos que en Barbosa y Vélez (Solarte *et al.*, 2010c). Por tal razón, es probable que la



**Figura 2.** Análisis de componentes principales con gráfico biplot de carotenoides totales, clorofila total y pectinas en variedades de guayaba por localidad y estado de madurez. Localidades: Puente Nacional (P), Barbosa (B) y Vélez (L). Variedades: Regional Blanca (BL), Ráquira Blanca (Q), Guavatá Victoria (G) y Regional Roja (R). Estados de madurez: Verde (V), Madurez fisiológica (F), Pintón (T) y Maduro (M).



**Figura 3. Análisis de componentes principales con gráfico biplot de carotenoides totales, clorofila y pectinas de la variedad Regional Roja en relación con localidades y estado de madurez. Puente Nacional (P), Barbosa (B), Vélez (L); Verde (V), Madurez fisiológica (F), Pintón (T), Maduro (M).**



**Figura 4. Dendrograma obtenido mediante el análisis de conglomerado jerárquico (distancia euclidiana, consolidado por el método K-means) de carotenoides totales, clorofila y pectinas en la variedad Regional Roja (R) según localidad [Puente Nacional (P), Barbosa (B), Vélez (L)] y estado de madurez [(Verde (V), Madurez fisiológica (F), Pintón (T), Maduro (M)].**

temperatura sea el factor que más influya en la composición de carotenoides al interactuar con el ambiente, específicamente por la diferencia de temperaturas entre cada localidad. Se ha reportado que en frutos de camu-camu (*Myrciaria dubia*) la mayor temperatura y exposición a la luz son los principales factores responsables del alto contenido de carotenoides (Zanatta y Mercadante, 2014). Además, la producción de carotenoides en frutas también depende del grado de maduración (Becker *et al.*, 2015).

## CONCLUSIONES

El mayor contenido significativo de pectina se presentó en las variedades Regional Blanca y Regional Roja de Puente Nacional y Vélez, respectivamente, en la etapa de madurez fisiológica.

Se encontró relación directa entre el contenido de carotenoides, clorofila y pectinas en todas las variedades de pulpa blanca (Regional Blanca, Ráquira Blanca y Guavatá Victoria). La variedad Regional Roja presentó relación inversa entre el contenido de carotenoides y el contenido de pectinas y clorofila.

La variedad Regional Roja presentó los mayores contenidos de carotenoides totales principalmente en la localidad de Puente Nacional, y de clorofila y pectinas en Barbosa y Vélez; datos que pueden ser aprovechados y orientados en actividades productivas para el desarrollo agroindustrial de la guayaba en Colombia.

## AGRADECIMIENTOS

La financiación de la investigación fue dada por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia (contrato 094-1/06 "Caracterización ecofisiológica de variedades de guayaba por función de uso"), Universidad Nacional de Colombia, Asohfrucol, Corpoica CIMPA, y Comestibles el Éxito. Los autores agradecen el soporte financiero al trabajo de grado de Jacqueline Guavita-Vargas a través del proyecto en mención.

**Conflicto de intereses:** el manuscrito fue preparado y revisado con la participación de los autores, quienes declaran no tener algún conflicto de interés que coloquen en riesgo la validez de los resultados aquí presentados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Goukh, A. y H. Bashir. 2003. Changes in pectic enzymes and cellulase activity during guava fruit ripening. *Food Chem.* 83, 213-218. Doi: 10.1016/S0308-8146(03)00067-0
- Ali, Z.M., L. Chin y H. Lazan. 2004. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. *Plant Sci.* 167, 317-327. Doi: 10.1016/j.plantsci.2004.03.030
- Ayour, J., M. Sagar, M. Najib, M. Taourirte y M. Benichou. 2016. Evolution of pigments and their relationship with skin color based on ripening in fruits of different Moroccan genotypes of apricots (*Prunus armeniaca* L.). *Sci. Hortic.* 207, 168-175. Doi: 10.1016/j.scienta.2016.05.027
- Becker, P., M. Sganzerla, A. Jacques, M. Teixeira y R. Zambiasi. 2015. Carotenoids, tocopherols and ascorbic acid content in yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) grown under different cultivation systems. *Food Sci. Technol.* 64, 259-263. Doi: 10.1016/j.lwt.2015.05.031
- Cantillo, J., D.C. Sinuco, M.E. Solarte y L.M. Melgarejo. 2011. Estudio comparativo de los compuestos volátiles de tres variedades de guayaba blanca (*Psidium guajava* L.) durante su maduración. *Rev. Colomb. Quím.* 40, 79-90.
- Cheng-Chang, L. y T. Ching-Hua. 2014. Assessing guava maturity by statistical analyses of dropped fruit impact responses. *Postharvest Biol. Technol.* 95, 20-27. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2014.03.013
- Das, A. y K. Majumder. 2010. Fractional changes of pectic polysaccharides in different tissue zones of developing guava (*Psidium guajava* L.) fruits. *Sci. Hortic.* 125, 406-410. Doi: 10.1016/j.scienta.2010.04.041
- De la Garza, J., B. Morales y B. González. 2013. Análisis estadístico multivariante. Un enfoque teórico y práctico. Mc Graw Hill, México, DE.
- Delgado-Pelayo, R., L. Gallardo-Guerrero y D. Hornero-Méndez. 2014. Chlorophyll and carotenoid pigments in the peel and flesh of commercial apple fruit varieties. *Food Res. Int.* 65, 272-281. Doi: 10.1016/j.foodres.2014.03.025
- Ferreira, S. 2007. Pectinas: aislamiento, caracterización y producción a partir de frutas tropicales y de los residuos de su procesamiento industrial. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Fischer, G., L.M. Melgarejo y D. Miranda. 2012. Guayaba (*Psidium guajava* L.). pp. 526-549. En: Fischer, G. (ed.). Manual para el cultivo de frutales en el trópico. Producciones, Bogotá, Colombia.
- Flores, G., S. Wu, A. Negrin y E. Kennelly. 2015. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars



- of guava (*Psidium guajava* L.) fruits. *Food Chem.* 170, 327-335. Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.08.076
- Flores-Vindas, E. 1999. La planta: estructura y función. 3a ed. Asociación de Editoriales, Cartago, Costa Rica.
- García-Betanzos, C., H. Hernández-Sánchez, T. Bernal-Couoh, D. Quintanar-Guerrero y M. Zambraño-Zaragoza. 2017. Physicochemical, total phenols and pectin methylesterase changes on quality maintenance on guava fruit (*Psidium guajava* L.) coated with candeuba wax solid lipid nanoparticles-xanthan gum. *Food Res. Int.* 101, 218-227. Doi: 10.1016/j.foodres.2017.08.065
- González, I.A., C. Osorio, J. Meléndez-Martínez, M.L. González-Miret y F.J. Heredia. 2011. Application of tristimulus colorimetry to evaluate colour changes during ripening of Colombian guava (*Psidium guajava* L.) varieties with different carotenoid pattern. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46, 840-848. Doi: 10.1111/j.1365-2621.2011.02569.x
- Gwanpua, S., S. Van Buggenhout, B. Verlinden, S. Christiaens, A. Shpigelman, V. Vincent, Z. Jamsazzadeh, B. Nicolai, M. Hendrickx y A. Geeraerd. 2014. Pectin modifications and the role of pectin-degrading enzymes during postharvest softening of Jonagold apples. *Food Chem.* 158, 283-291. Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.02.138
- Hulme, A. 1970. The biochemistry of fruits and their products. Academic Press, London, UK.
- Jain, N., K. Dhawan, S. Malhotra y R. Singh. 2003. Biochemistry of fruit ripening of guava (*Psidium guajava* L.): Compositional and enzymatic changes. *Plant Foods Hum. Nutr.* 58, 309-315.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth. Enzymol.* 148, 350-382.
- Lima, S., E. Paiva., S. Andrade y J. Paixão. 2010. Fruit pectins-A suitable tool for screening gelling properties using infrared spectroscopy. *Food Hydrocoll.* 24, 1-7. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.04.002
- Maji, S., B.C. Das y S.K. Sarkar. 2015. Efficiency of some chemicals on crop regulation of Sardar guava. *Sci. Hortic.* 188, 66-70. Doi: 10.1016/j.scienta.2015.03.015
- Matile, P. y S. Hörtensteiner. 1999. Chlorophyll degradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 67-95.
- Melgarejo, L.M. (ed.). 2010. Experimentos en fisiología vegetal. Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Murillo, E., A.J. Meléndez-Martínez y F. Portugal. 2010. Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin. *Food Chem.* 122, 167-172. Doi: 10.1016/j.foodchem.2010.02.034
- Osorio, C., D.P. Forero y J.G. Carriazo. 2011. Characterisation and performance assessment of guava (*Psidium guajava* L.) microencapsulates obtained by spray-drying. *Food Res. Int.* 44, 1174-1181. Doi: 10.1016/j.foodres.2010.09.007
- Singh, S.P. 2011. Guava (*Psidium guajava* L.). pp. 213-240. En: Yahía, E.M. (ed.). *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits.* Woodhead publishing Limited, Sawston, Cambridge, UK.
- Sinuco, D.C., M. Steinhau, P. Schieberle y C. Osorio. 2010. Changes in odour-active compounds of two varieties of Colombian guava (*Psidium guajava* L.) during ripening. *Eur. Food Res. Technol.* 230, 859-864. Doi: 10.1007/s00217-010-1232-8
- Solarte, M.E., L.M. Melgarejo, O. Martínez, M.S. Hernández y J. P. Fernández-Trujillo. 2014. Fruit quality during ripening of Colombian guava (*Psidium guajava* L.) grown at different altitudes. *J. Food Agric. Environ.* 12, 669-675.
- Solarte, M.E., M.S. Hernández., A. Morales, J. Fernández-Trujillo y M. Melgarejo. 2010a. Caracterización fisiológica y bioquímica del fruto de guayaba durante la maduración. pp. 111-116. En: Morales, A.L. y L.M. Melgarejo (eds.). *Desarrollo de productos funcionales promisorios a partir de la guayaba (*Psidium guajava* L.) para el fortalecimiento de la cadena productiva.* Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Solarte, M.E., O. Insuasty y L.M. Melgarejo. 2010b. Calendario fenológico de la guayaba en la hoya del río Suárez. pp. 59-82. En: Morales, A.L. y L.M. Melgarejo (eds.). *Desarrollo de productos funcionales promisorios a partir de la guayaba (*Psidium guajava* L.) para el fortalecimiento de la cadena productiva.* Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Solarte, M.E., H.M. Romero y L.M. Melgarejo. 2010c. Caracterización ecofisiológica de la guayaba de la hoya del río Suárez. pp. 25-56. En: Morales, A.L. y L.M. Melgarejo (eds.). *Desarrollo de productos funcionales promisorios a partir de la guayaba (*Psidium guajava* L.) para el fortalecimiento de la cadena productiva.* Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Steinhau, M., D. Sinuco, J. Polster, C. Osorio y P. Schieberle. 2008. Characterization of the aroma-active compounds in pink guava (*Psidium guajava* L.) by application of the aroma extract dilution analysis. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4120-4127. Doi: 10.1021/jf8005245
- Stinco, C., A. Benítez-González, D. Hernanz, I. Vicario y A. Meléndez-Martínez. 2014. Development and validation of a rapid resolution liquid chromatography method for the screening of dietary plant isoprenoids: Carotenoids, tocopherols and chlorophylls. *J. Chromatogr. A.* 1370, 162-170. Doi: 10.1016/j.chroma.2014.10.044
- Vargas-Murga, L., V.V. De Rosso, A.Z. Mercadante y B. Olmedilla-Alonso. 2016. Fruits and vegetables in the Brazilian household budget survey (2008-2009):

- carotenoid content and assessment of individual carotenoid intake. *J. Food Compos. Anal.* 50, 88-96. Doi: 10.1016/j.jfca.2016.05.012
- Vasconcelos, A.G., A. Amorim, R.C. Dos Santos, J.M. Souza, L.K. De Souza, T. Araújo, L.A.D. Nicolau, L.L. Carvalho, P.E. Aquino, C.S. Martins, C.D. Ropke, P.M.G. Soares, S. Aparecida, S. Kuckelhaus, J.-V.R. Medeiros y J.R. Leite. 2017. Lycopene rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) displays anti-inflammatory and antioxidant profile by reducing suggestive hallmarks of acute inflammatory response in mice. *Food Res. Int.* 99, 959-968. Doi: 10.1016/j.foodres.2017.01.017
- Wisutiamonkul, A., S. Promdang, S. Ketsa y W. Van Doorn. 2015. Carotenoids in durian fruit pulp during growth and postharvest ripening. *Food Chem.* 180, 301-305. Doi: 10.1016/j.foodchem.2015.01.129
- Zanatta, C.F. y A.Z. Mercadante. 2007. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Food Chem.* 101, 1526-1532. Doi: 10.1016/j.foodchem.2006.04.004

# Preliminary evaluation of associated viruses in production systems of cape gooseberry, purple passion fruit, and rose

## Evaluación preliminar de virus asociados a sistemas productivos de uchuva, gulupa y rosa

JOSEPH CUTLER<sup>1, 9</sup>  
JULIANE LANGER<sup>1</sup>  
SUSANNE VON BARGEN<sup>1</sup>  
ORLANDO ACOSTA-LOSADA<sup>2</sup>  
FÁNOR CASIERRA-POSADA<sup>3</sup>  
ADRIANA CASTAÑEDA-CÁRDENAS<sup>4</sup>  
MÓNICA BETANCOURT-VÁSQUEZ<sup>5</sup>  
WILMER CUELLAR<sup>6</sup>  
EDUARDO ARVYDAS-STASIUKYNAS<sup>7</sup>  
DENISE ALTENBACH<sup>8</sup>  
CARMEN BÜTTNER<sup>1</sup>

**Fruit deformation and leaf blistering in purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims).**

Photo: J. Cutler



### ABSTRACT

Plant viruses may pose a threat to crops in Colombia. To evaluate the potential risk of yield losses due to plant virus infection, a literature analysis followed by a first field study was carried out focusing on purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims), cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.), and ornamental rose (*Rosa* sp.), which are important Colombian exports. Over the past three years, plant material was collected from 21 farms in

<sup>1</sup> Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Berlin (Germany). ORCID Cutler, J.: 0000-0002-2027-9649; ORCID Langer, J.: 0000-0001-6574-3831; ORCID Bargaen, S.v.: 0000-0001-8321-1572; ORCID Büttner, C.: 0000-0002-2086-2594

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina, Bogotá (Colombia). ORCID Acosta-Lozada, O.: 0000-0002-1267-098X

<sup>3</sup> Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Facultad de Ciencias Agropecuarias, Tunja (Colombia). ORCID Casierra-Posada, F.: 0000-0001-7508-5174

<sup>4</sup> Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Dirección Técnica de Análisis y Diagnóstico Agrícola, Bogotá (Colombia). ORCID Castañeda-Cárdenas, A.: 0000-0003-1403-6787

<sup>5</sup> Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Mosquera (Colombia). ORCID Betancourt-Vásquez, M.: 0000-0002-6702-9524

<sup>6</sup> International Center for Tropical Agriculture (CIAT), Cali (Colombia). ORCID Cuellar, W.: 0000-0003-4702-3237

<sup>7</sup> Hacienda Misiones, Mesitas del Colegio (Colombia). ORCID Arvydas-Stasiukynas, E.: 0000-0002-3140-0803

<sup>8</sup> BIOREBA Laboratories, Reinach (Switzerland). ORCID: Altenbach, D.: 0000-0003-2774-2437

<sup>9</sup> Corresponding author. [joseph.cutler@agrar.hu-berlin.de](mailto:joseph.cutler@agrar.hu-berlin.de)

Cundinamarca and Boyacá, Colombia, two regions that are in close proximity to El Dorado International Airport, the country's largest air freight terminal. Plants were visually inspected and subsequently tested by bioassay and serological methods. Overall, in the samples investigated by the two diagnostic methods, plant viruses were detected. Detected viruses belong to the genus *Poty-*, *Tobamo-*, *Nepo-*, *Ilar-*, and *Tospovirus*. The extent of the distribution and occurrence of these viruses in each crop has to be determined in a representative field study. Such a monitoring program could be supported by a standardized farmer interview. The development of suitable plant virus diagnostic and management tools is the focus of a cooperation project between German and Colombian universities, the Colombian Agricultural Institute (ICA), the Colombian Corporation of Agricultural Investigation (AGROSAVIA) and the International Center for Tropical Agriculture (CIAT).

**Additional key words:** *Physalis peruviana*, *Rosa* sp., *Passiflora edulis* Sims, crop protection, plant disease diagnosis.

## RESUMEN

Los virus representan una amenaza para las plantas cultivadas en Colombia, y algunos estudios indican que las pérdidas económicas causadas por estos problemas fitosanitarios podrían evitarse mediante procedimientos preventivos estándar. Como objeto de estudio, se seleccionaron tres importantes productos de Colombia, como lo son: rosa ornamental (*Rosa* sp.), uchuva (*Physalis peruviana* L.) y gulupa (*Passiflora edulis* Sims). En el presente artículo, se muestran los primeros desarrollos resultantes del monitoreo de virus en estas plantas, para determinar el estado de las virosis en fincas colombianas. Se realizaron análisis serológicos de 21 fincas en Cundinamarca y Boyacá, Colombia, en 2016-18. El objetivo de esta investigación fue el desarrollo de un protocolo piloto para el diagnóstico rutinario, que se pueda aplicar en un programa de certificación de material vegetal para la determinación de la presencia de virus, en varios productos hortícolas colombianos. Con base en este protocolo, se pueden determinar los riesgos que representan ciertos virus y se puede considerar la necesidad de certificar el material de siembra evaluado según la presencia de virus. Se están desarrollando herramientas de diagnóstico confiables y prácticas, para la detección de los virus más relevantes, en un proyecto conjunto entre universidades alemanas y colombianas, el Instituto Colombiano de Agropecuario (ICA), la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) y el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

**Palabras clave adicionales:** *Physalis peruviana*, *Rosa* sp., *Passiflora edulis* Sims, protección de cultivos, diagnóstico de enfermedades de plantas.

Received for publication: 05-03-2017 Accepted for publication: 30-05-2018

## INTRODUCTION

Colombia's agricultural export sector has advanced and in parallel the need for phytosanitary control has become more important. There is knowledge about the presence of pests, fungi, and bacterial diseases, but only little about plant viruses and their potential impact on plant or fruit quality and yield quantity. We focused on cape gooseberry (*Physalis peruviana*), rose (*Rosa* sp.), and purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims), three important plant cultivars for Colombia's export market.

Cape gooseberry, known as uchuva in Colombia, belongs to the family *Solanaceae* and genus *Physalis*. Colombia is the largest producer of uchuva followed by South Africa (Mazorra *et al.*, 2006). Uchuva

started to have commercial importance in Colombia in 1985 (Chaves, 2006). Colombia is the country with the largest area of cultivation, from 800 to 1,000 ha producing between 15 to 18 t ha<sup>-1</sup> (Fischer *et al.*, 2014). The quality of domestic and exportable postharvest uchuva is largely correlated with proper plant pathogen management. Cape gooseberry is affected by pests and several fungal, bacterial and viral pathogens. Increasing occurrence may be due to uncontrolled distribution of primary planting material among the farmers. Fungal pathogens such as *Fusarium oxysporum*, *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Phytophthora infestans*, *Cercospora* spp., and *Phoma* spp., the bacterial pathogen *Ralstonia solanacearum*, and plant viruses belonging to the genus *Alfamovirus*,



*Bigeminivirus*, *Comovirus*, *Cucumovirus*, *Fabavirus*, *Furovirus*, *Hybrigeminivirus*, *Ilarvirus*, *Luteovirus*, *Nepovirus*, *Orthotospovirus*, *Potexvirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus*, and *Tymovirus* have been reported to occur in cape gooseberry (Rodríguez *et al.*, 2016; Aguirre-Ráquira *et al.*, 2014). But only few studies present deeper research into the complete genomic sequence and the complex relationship between genotype and phenotype of such plant viruses. For instance, Gutiérrez *et al.* (2015) present the complete genome sequence of an isolate of *Potato virus X* (PVX) infecting cape gooseberry in Colombia.

Purple passion fruit, known as gulupa in Colombia, belongs to the family *Passifloraceae* and genus *Passiflora*. The main diseases infecting gulupa in Colombia were summarized by Gutiérrez *et al.* (2015). They include the bacteria *Xanthomonas axonopodis* and the viruses *Soybean mosaic virus* (SMV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV). On a global level further viruses have been described: *Passion fruit ringspot virus* (PFRSV), *Passiflora virus Y* (PaVY), *East Asian passiflora virus* (EAPV), *Okra mosaic virus* (OkMV), *Maracuja mosaic virus* (MarMV), *Passion fruit crinkle virus* (PCV), *Passion fruit rhabdovirus* (PRV), *Passiflora latent virus* (PLV), *Passion fruit mottle virus* (PFMoV), *Purple granadilla mosaic virus* (Gil *et al.*, 2017), and *Passion fruit yellow mosaic virus* (PFYMV) (Morales *et al.*, 2002).

Ornamental roses are perennial flowering plants of the genus *Rosa*, in the family *Rosaceae*. The floral industry is dominated by Holland, which produces 83% of the world's cut flowers, followed by Colombia, the second largest exporter worldwide (PMA, 2015). The main exported flower from Colombia is the rose which totals 365 million USD, and 70% of its cut roses are exported to the USA (PMA, 2015). Global studies have reported the following viruses to infect rose: *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) (Fajardo *et al.*, 2015), *Apple mosaic virus* (ApMV) (Sertkaya, 2010; Abtahi, 2015), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV) (Abtahi, 2015), *Tobacco ringspot virus* (TRSV) (McDaniel *et al.*, 1971), *Tomato ringspot virus* (ToRSV) (Halliwell and Milbrath, 1962), *Raspberry ringspot virus* (RRSV) (Von Bargaen *et al.*, 2015), *Rose yellow leaf virus* (RYLV) (Mollov *et al.*, 2014), and *Rose rosette virus* (RRV) (Laney *et al.*, 2011).

To extend the knowledge on both the occurrence of plant viruses in cape gooseberry, purple passion fruit and ornamental roses and their impact on crop yield and quality, we conducted a first field study. Biological and serological laboratory investigations completed the visual inspection of selected fields in the main growing area of these crops.

## MATERIAL AND METHODS

Forty-four fields on 21 farms were inventoried for the incidence of virus-suspected symptoms in cape gooseberry, purple passion fruit, and rose in one of the main exporting Colombian cultivation areas (Fig. 1). Visual inspection is always the first step to identify the cause of plant damage. On the basis of the observed symptoms, laboratory investigations can be initiated to confirm the particular suspicion. We focused on virus-suspected symptoms such as chlorotic discoloration, leaf blistering, necrosis, stunting, and partial decline. Mechanical inoculation of the putative viral pathogen with the diseased tissue on indicator plants was applied to verify the infectivity of the agent. Different enzyme-linked immune assays (ELISA) were used to identify the viral pathogens.

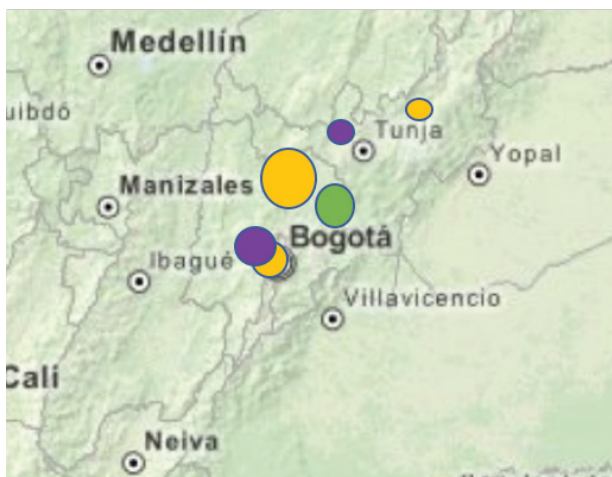
### Sampling

The field survey was carried out from 2016 to 2018 and comprised 21 national and export production sites in the Cundinamarca and Boyaca departments of Colombia (Fig. 1). The distribution of the sites visited were 10 cultivated farms of cape gooseberry, five of purple passion fruit and six of ornamental roses. Initial assessment of the health status of the plants in the field was conducted with a stratified random sampling pattern according to Delp *et al.* (1986) (Fig. 1). The distribution of the sites visited were 10 cultivated farms of cape gooseberry, five of purple passion fruit and six of ornamental roses. This pattern divides the field into regions of higher and lower disease risk. The disease foci were established by the general managers of each farm. As recommended, samples were collected from disease foci, as well as along other parts of the fields (Mavrodieva, 2004). Percent error is reduced using this sampling design compared to systematic entire field X and W shaped patterns or diagonal or partial field sampling patterns (Fletcher, 2006). To represent the impacted area, 10 to 20 samples were taken based on farm size, if procurable. Samples were collected in BIOREBA® extraction bags, transported in cooler bags and stored at 4°C before being investigated.

### Mechanical inoculation

Bioassays are used to diagnose a virus by its reactions in a variety of plant species, to test the infectivity of an isolate using local lesion hosts, and to propagate viruses. According to Hull (2009) plant homogenate was rubbed onto the surface of the leaf of the test plant to break the surface cells without causing too





**Figure 1. Sampling sites in Cundinamarca and Boyacá, Colombia: cape gooseberry (orange), purple passion fruit (purple), ornamental rose (green).**

much mechanical damage. *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun-NN, and *Cucumis sativus* were used as test plants.

### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The detection of plant viruses using the ELISA was introduced to plant virology in the late 1970s. This method was selected among the diagnostic techniques due to its affordability, extreme sensitivity, and potential for measurement (Clark and Adams, 1977). ELISA was conducted with leaf material at Humboldt University (Berlin, Germany) and BIOREBA laboratories (Reinach, Switzerland) using available antibodies of previously described known viruses: *Cucumber Mosaic Virus* (CMV), *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco mosaic virus* (TMV), and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in passion fruit and cape gooseberry, *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Tobacco streak virus* (TSV), *Arabid mosaic virus* (ArMV), and *Tomato ringspot virus* (ToRSV) in rose, and *Soybean mosaic virus*

(SMV) in passion fruit. In addition to these plant virus species specific tests carried out in the Double Antibody sandwich-ELISA format, a Plate-Trapped Antibody (PTA)-ELISA using a *Potyvirus*-group specific antibody was performed to test plant material of all three cultivars. All tests were carried out according to protocols recommended by the supplier.

## RESULTS AND DISCUSSION

Virus suspected symptoms were observed in all three crops: cape gooseberry, purple passion fruit and ornamental roses (Fig. 2). Plants showed mild to extreme yellowing, browning, stunting, spots, mosaics, curling, blistering, mottling, chlorosis, ringspots, deformation, discoloration, vein clearing, and variegation in leaves, fruits, and flowers. A total of 320 samples of 113 cape gooseberry, 112 purple passion fruit, and 95 ornamental roses were collected and examined for different globally known viruses in the laboratory. After specific viruses were not detectable in our samples [e.g. Potyvirus-group, PVY, TMV, CMV (in all cultivars), ArMV (in rose), and ToRSV, TSWV (in physalis)], testing of these viruses was discontinued. The SMV antibody was only tested for samples collected in 2018, as it was only first developed for passion fruit by BIOREBA at this time. Overall, various viruses have been detected by ELISA so far, yet none of the detected viruses could be transmitted by mechanical inoculation to herbaceous test plants.

All passion fruit farms had plants with symptoms of wilting, yellowing in leaves, distorted, decayed, and/or misshapen fruit with a similar scattered distribution in high and low areas. In three of the five farms inspected, passion fruit showed unique zebra striped mottling or blistering symptoms of leaves and fruits. Only four out of 112 samples tested were infected with *Soybean mosaic virus* (Tab. 1). Applying the ELISA this infection was detected first by a genus-specific

**Table 1. Detection of particular plant viruses in fruit and leaf samples of diseased cape gooseberry, purple passion fruit and ornamental roses (ArMV: *Arabid mosaic virus*, PNRSV: *Prunus necrotic ringspot virus*, PVY: *Potato virus Y*, TMV: *Tobacco mosaic virus*, ToRSV: *Tomato ringspot virus*, TSV: *Tomato streak virus*, TSWV: *Tomato spotted wilt virus*, SMV: *Soybean mosaic virus*). Numbers: virus infected plants/tested plants/collected plants; nt: not tested).**

Crop	ArMV	PNRSV	Potyvirus	PVY	TMV	ToRSV	TSV	TSWV	SMV
Purple passion fruit	nt	nt	4//101/112	0/68/112	0/68/112	nt	nt	0/33/112	4//64/112
Cape gooseberry	nt	nt	11//113/113	3/113/113	0/89/113	nt	nt	0/51/113	nt
Ornamental roses	0/82/95	47/95/95	1/59/95	nt	nt	0//49/95	3/95/95	nt	nt



**Figure 2.** Characteristic symptoms associated with plant virus infection. Row 1: purple passion fruit with discoloration (left), leaf with mosaic (right top) and blistering (right below). Row 2: cape gooseberry with yellow and stunting (left) and vein necrosis (right). Row 3: ornamental rose leaf with oak leaf pattern (left) and mottling (right).

antibody and confirmed to be *Soybean mosaic virus* by using a species specific antibody which was recently developed by BIOREBA to be applied in passion fruit. The four samples, each representing an individual plant, came from two different farms.

Cape gooseberry plants from all farms exhibited similar symptoms of yellowing, leaf spots, mosaic, and distorted fruits. But only 11 out of 113 samples proved to be infected with one of the tested plant viruses (Tab. 1) and originated from seven farms. Those plants are infected with a potyvirus, leaf material of three of them reacted with an antibody against PVY, the type member of the genus potyvirus. Further studies should identify and characterize the Potyvirus infecting cape gooseberry. It might be a distinct strain of PVY, or a potyvirus not known in cape gooseberry so far or even not at all.

In all of the six rose farms that were involved in the field survey, there was at least one sample containing a plant virus in a scattered distribution in rows. An infection with PNRSV could be detected in about 50% of tested roses, 3 out of 95 plants tested plants revealed an infection with TSV, one with a *Potyvirus* (Tab. 1). Most plants that tested positive for PNRSV in ELISA showed a characteristic chlorotic line pattern, named oak leaf pattern. In four farms, all symptomatic leaf samples taken from the variety Freedom were PNRSV-infected independent on the farm they were taken. Samples of the varieties Topaz and Blues were infected with that virus in two of the six farms. This distribution and the fact that no insect vector is known, in spite of extensive surveys suggests that the virus was introduced to the farm with the propagation material, rootstocks or scions.

Significant research on viruses in Colombia has been carried out in recent years. A novel ilarvirus infecting purple passion fruit was detected in Cundinamarca by RT-PCR in the Humboldt University in 2018. Vaca-Vaca *et al.* (2017) characterized the complete genome sequence of a begomovirus infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) in Valle del Cauca. In Antioquia, Gallo-Garcia *et al.* (2018) have reported the genome sequence of a novel ilarvirus infecting physalis. It is advisable that further research on the presence of viruses in ornamental roses in Colombia be carried out.

## RECOMMENDATIONS AND CONCLUSIONS FROM THIS STUDY

Our results are a preliminary investigation of the occurrence of plant viruses in Cape gooseberry, purple passion fruit and ornamental roses in Colombia and do not give a reliable countrywide survey in terms of region, climatic conditions, mode of cultivation and

cultivars. In this first field survey few plant viruses could be detected in the 320 samples. The damage of the plants are therefore either due to other harmful organisms, or caused by previously untested or unknown viruses. A state of the art high-throughput sequencing (NGS) approach should be applied to discover more viruses. With such an approach novel viruses and/or virus complexes can be determined or excluded as the causes of the observed damage.

On the basis of an intensive monitoring and screening at different Colombian production sites the occurrence and impact of particular plant viruses can be determined and economic thresholds can be estimated. With this research, management programs can be recommended.

Such programs would involve training of farmers in recognizing early symptoms of a disease, on-site diagnostic tools to be used by consultants, sanitation measures like disinfection of knives while grafting, and certification of propagation material. Certification of mother seeds, rootstocks and scions to be virus-tested can prevent the transmission and distribution of plant viruses in the field and country, respectively. Farmers propagating their own plants should be aware that even mother plants infected with a virus can infect generative or vegetative relatives. Depending on the virus, this can result in high losses. Training schools and routine diagnostic tools are being developed for a national agricultural certification program that could be established in a common project between German and Colombian universities, the Colombian Agricultural Institute (ICA), the Colombian Corporation of Agricultural Investigation (AGROSAVIA) and the International Center for Tropical Agriculture (CIAT).

An increased attention to the use of virus-free plant material will support Colombian agricultural products domestically and in international export markets (Cutler *et al.*, 2017). A certification of virus-tested plant material can contribute to better quantity and quality in production and contributes to better trade policy decision-making. Many stakeholders in the Colombian supply chain would gain from the knowledge and practical experience in controlling plant pathogens, from small farmers to the major worldwide distributors of Colombia's agricultural and horticultural products.

## ACKNOWLEDGMENTS

Special thanks to Oscar Enrique Fuentes Murillo, Emilio Arévalo Peñaranda and all staff of the Instituto

Colombiano Agropecuario (ICA) involved in the sampling effort, Sergio Lloreda of OCATI for organizing transportation to farms, and the Alcalde Mayor of Bogota Enrique Peñalosa Londoño for his advocacy of plant pathology research in Colombia. Special thanks to Gerhard Fischer of the National University of Colombia for initiating and supporting this project from the beginning. Special thanks to Martina Bandte of Humboldt Universität zu Berlin for her review of the manuscript. Also many thanks to the COST DIVAS Action FA1407 for financial support to participate in meetings and workshops, and for scientific support by members on best practices of NGS technologies in plant virus diagnostics.

**Conflict of interests:** the manuscript was prepared and reviewed with the participation of the authors, who declare that there exists no conflict of interest that puts the validity of the presented results at risk.

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Abtahi, F.S. 2015. Detection and distribution of the important viruses infecting damask rose in floricultures of Isfahan, Markazi, and Kerman Provinces. *Modern Gen. J.* 10(1), 11-20.
- Aguirre-Ráquira, W., D. Borda, and L. Hoyos-Carvajal. 2014. Potyvirus affecting uchuva (*Physalis peruviana* L.) in Centro Agropecuario Marengo, Colombia. *Agric. Sci.* 5, 897-905. Doi: 10.4236/as.2014.510097
- Chaves, A. 2006. Propagação e avaliação fenológica de *Physalis* sp. na região de Pelotas-RS. Ph.D. thesis. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brazil.
- Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. General Virol.* 34(3), 475-483. Doi: 10.1099/0022-1317-34-3-475
- Cutler, J., C. Lüchau, J. Langer, S. von Bargen, O.L. Acosta, F. Casierra-Posada, A. Cárdenas, M.B. Vásquez, W. Cuellar, E.A. Stasiukynas, and E. Arévalo-Peñaranda. 2017. Development of a certification program for virus-tested plant material in Colombia: A collaborative initiative. Book of Abstracts. Tropentag 2017, September 20-22, Bonn, Germany.
- Delp, B.R., L.J. Stowell, and J.J. Marois. 1986. Evaluation of field sampling techniques for estimation of disease incidence. *Phytopathology* 76, 1299-1305.
- Fajardo, T.V.M., M.B. Nascimento, M. Eiras, O. Nickel, and G. Pio-Ribeiro. 2015. Molecular characterization of *Prunus* necrotic ringspot virus isolated from rose in Brazil. *Ciênc. Rural* 45(12), 2197-2200. Doi: 10.1590/0103-8478cr20141810



- Fischer, G., P.J. Almanza-Merchán, and D. Miranda. 2014. Importancia y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). Rev. Bras. Frutic. 36(1), 1-15. Doi: 10.1590/0100-2945-441/13
- Fletcher, J., C. Bender, B. Budowle, W.T. Cobb, S.E. Gold, C.A. Ishimaru, and R.C. Seem. 2006. Plant pathogen forensics: capabilities, needs, and recommendations. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70(2), 450-471. Doi: 10.1128/MMBR.00022-05
- Gallo-García, Y.M., H. Jaramillo-Mesa, L.F. Toro-Fernández, M. Marín-Montoya, and P.A. Gutiérrez. 2018. Characterization of the genome of a novel ilarvirus naturally infecting Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) Arch. Virol. 163, 1713-1716. Doi: 10.1007/s00705-018-3796-8
- Gil, J.G.R., P.J. Tamayo, and J.G. Morales. 2017. Identification and pathogenicity of microorganisms affecting purple passion fruit in Colombia. Rev. Ceres 64(3), 250-257. Doi: 10.1590/0034-737x201764030005
- Gutiérrez, P.A., J.F. Alzate, and M.M. Montoya. 2015. Complete genome sequence of an isolate of *Potato virus X* (PVX) infecting Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) in Colombia. Virus Genes 50(3), 518-522. Doi: 10.1007/s11262-015-1181-1
- Halliwell, R. and J. Milbrath. 1962. Isolation and identification of tomato ringspot virus associated with rose plants and rose mosaic virus. Plant Repr. 46, 555-557.
- Hull, R. 2009. Mechanical inoculation of plant viruses. Curr. Protoc. Microbiol. 13, 16B.6.1-6.4.
- Laney, A.G., K.E. Keller, R.R. Martin, and I.E. Tzanetakis. 2011. A discovery 70 years in the making: characterization of the Rose rosette virus. J. General Virol. 92(7), 1727-1732. Doi: 10.1099/vir.0.031146-0
- Lüchau, C., J. Cutler, J. Langer, S. von Bargaen, and C. Büttner. 2017. Detection and characterisation of a new ilarvirus in *Passiflora edulis*. Book of Abstracts, Tropentag 2017, September 20-22, Bonn, Germany.
- Mavrodieva, V., L. Levy, and D.W. Gabriel. 2004. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. Phytopathology 94, 61-68. Doi: 10.1094/phyto.2004.94.1.61
- Mazorra, M.F., Á.P. Quintana, D. Miranda, G. Fischer, and M. Chaparro de Valencia. 2006. Aspectos anatómicos de la formación y crecimiento del fruto de uchuva *Physalis peruviana* (Solanaceae). Acta Biol. Colomb. 11(1), 69-81.
- McDaniel, G.L., G.J. Buck, and R.E. Ford. 1971. Isolation of tobacco ringspot virus from rose. Phytopathology 61, 45-49.
- Mollov, D., B. Lockhart, and D. Zlesak. 2012. Identification, transmission, and genomic characterization of a novel member of the Caulimoviridae causing a yellow vein disease of cultivated rose. pp. 82-82. In: Phytopathology. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA.
- Morales, F.J., I. Lozano, M. Castaño, J. Arroyave, A.C. Velasco, and F. Varón. 2002. Partial characterization of a Tymovirus infecting passion fruit in Colombia, South America. J. Phytopathology 150(4-5), 292-296. Doi: 10.1046/j.1439-0434.2002.00740.x
- PMA (Produce Marketing Association). 2015. Colombian Floral Industry Overview. In: www.pma.com/content/articles/2015/04/colombian-floral-industry-overview; consulted: January 2018.
- Rodríguez, M.H., N. Niño, J. Cutler, J. Langer, F. Casier-ra-Posada, D. Miranda, and C. Büttner. 2016. Certification of healthy plant material in Colombia: A critical analysis of opportunities and challenges to control virus diseases. Rev. Colomb. Cienc. Hortíc. 10(1), 164-175. Doi: 10.17584/rcch.2016v10i1.4921
- Sertkaya, G. 2010. An investigation on rose mosaic disease of rose in Hatay Turkey. In: Proc. 21<sup>st</sup> International Conference on Virus and other Graft Transmissible Disease of Fruit Crops, 5-10 July 2009. Neustadt, Germany. Julius-Kühn-Archiv 427, 309-313.
- Vaca-Vaca, J.C., E.C. Carrasco-Lozano, and K. López-López. 2017. Molecular identification of a new begomovirus infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) in Colombia. Arch. Virol. 162, 573-576. Doi: 10.1007/s00705-016-3098-y
- Von Bargaen, S., R. Demiral, and C. Büttner. 2015. First detection of Raspberry ringspot virus in mosaic diseased hybrid roses in Germany. New Dis. Rep. 32, 18. Doi: 10.5197/j.2044-0588.2015.032.018

# Desenvolvimento e produção de melão Cantaloupe em função do espaçamento e ambientes de cultivo no Cerrado brasileiro

Development and production of Cantaloupe melon as a function of plant spacing and growing environments in the Brazilian Cerrado



EDUARDO PRADI VENDRUSCOLO<sup>1, 6</sup>  
ALEXSANDER SELEGUINI<sup>2</sup>  
LUIZ FERNANDES CARDOSO CAMPOS<sup>3</sup>  
ALINY HELOÍSA ALCÂNTARA RODRIGUES<sup>4</sup>  
SEBASTIÃO FERREIRA DE LIMA<sup>5</sup>

**Produção de melão em ambiente protegido no Cerrado brasileiro.**

Foto: E.P. Vendruscolo

## RESUMO

A cultura do melão é responsiva ao ambiente de cultivo e às técnicas de produção utilizadas, sendo estes fatores cruciais para a obtenção de frutos de maior qualidade. Desta forma, objetivou-se estudar, o crescimento vegetativo, o potencial produtivo e a qualidade de frutos de meloeiro Cantaloupe em função da redução do espaçamento em dois ambientes de cultivo. Em delineamento experimental de blocos ao acaso, plantas de meloeiro, cultivar Trinity, foram cultivadas em campo aberto e ambiente protegido, sob cinco espaçamentos entre plantas (15, 25, 35, 45 e 55 cm). Observou-se que a taxa de crescimento de plantas, a taxa de emissão foliar, bem como a espessura de casca e polpa, o teor de sólidos solúveis, e o *ratio* foram superiores sob cultivo protegido. Em relação aos espaçamentos, verificou-se que seu aumento influenciou, de forma linear e positiva, as características de massa seca de plantas, massa fresca de frutos e espessura da polpa. No entanto, o aumento da densidade de plantas aumentou a produtividade. Para velocidade de crescimento, velocidade de

<sup>1</sup> Unidade Universitária de Cassilândia, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UCC/UEMS), Cassilândia-MS (Brasil). ORCID Vendruscolo, E.P.: 0000-0002-3404-8534

<sup>2</sup> Campus Universitário de Iturama, Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Iturama-MG (Brasil). ORCID Seleguini, A.: 0000-0002-5762-9278

<sup>3</sup> Campus São Luís de Montes Belos, Universidade Estadual de Goiás (UEG), São Luís de Montes Belos-GO (Brasil). ORCID Campos, L.F.C.: 0000-0001-5171-5194

<sup>4</sup> Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás (EA/UFG), Goiânia-GO (Brasil). ORCID Rodrigues, A.H.A.: 0000-0002-3061-5730

<sup>5</sup> Campus de Chapadão do Sul, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CPCS/UFMS), Chapadão do Sul-MS (Brasil). ORCID Lima, S.F.d.: 0000-0001-5693-912X

<sup>6</sup> Autor para correspondência. [agrovendruscolo@gmail.com](mailto:agrovendruscolo@gmail.com)





emissão foliar e comprimento e circunferência de fruto constataram-se pontos de máximos de 47,50; 53,75; 49,95 e 47,51 cm, respectivamente. Em vista dos resultados, para regiões com condições semelhantes à do presente estudo, o cultivo do meloeiro Cantaloupe é favorecido em condições de cultivo protegido e espaçamentos entre 45 e 55 cm na linha de plantio.

**Palavras-chave adicionais:** *Cucumis melo* var. *reticulatus* Naud, melão rendilhado, bioma Cerrado, fator ambiental, densidade de plantio.

## ABSTRACT

Melon is responsive to the cultivation environment and the production techniques that are used, factors crucial for obtaining high quality fruits. The objective of this research was to study the vegetative growth, productive potential and quality of Cantaloupe melon fruits as a function of a reduction of spacing in two growing environments. Using a randomized block design, melon plants (cv. Trinity) were cultivated in an open field and a protected environment, with five different spacing between plants (15, 25, 35, 45 and 55 cm). It was observed that the plant growth rates, leaf emission rate, thickness of bark and pulp, total soluble solids content, and ratio were higher with the protected cultivation. For spacing, the increase influenced, in a linear and positive manner, the characteristics of dry mass of plants, fresh mass of fruits and thickness of the pulp. However, increasing the plant density increased productivity. For growth velocity, foliar emission velocity and fruit length and circumference, maximum points were observed when the plants were spaced at 47.50, 53.75, 49.95 and 47.51 cm from each other, respectively. Considering these results, for regions with similar conditions to the present study, the cultivation of the Cantaloupe melon is favored when conducted under protected cultivation conditions, with a plant spacing between 45 and 55 cm.

**Additional key words:** *Cucumis melo* var. *reticulatus* Naud, muskmelon, Cerrado biome, environmental factor, planting density.

Data de recepção: 24-10-2017 Aprovado para publicação: 30-05-2018

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o Brasil apresentou crescimento expressivo na produção de melões, passando de 350.000 t em 2003 para cerca de 521.000 t anuais em 2015, produzidos em uma área equivalente a 21.000 ha, resultando em uma produtividade média anual de 24,8 t ha<sup>-1</sup>. Apesar do cultivo de melão ser possível em praticamente todo o território brasileiro, a região Nordeste destaca-se como principal polo produtivo, detendo mais de 94,7% da produção nacional (IBGE, 2015; Vendruscolo *et al.*, 2017a).

No estado de Goiás a produção de melão é inexpressiva (IBGE, 2015), porém, apresenta excelentes condições ambientais para a exploração comercial da cultura, notadamente no outono inverno, dada a

combinação de altas temperaturas com ausência de chuvas. Esta característica climática lhe confere aptidão para o cultivo do meloeiro, pois a qualidade dos frutos é favorecida por condições de altas temperaturas e baixa umidade relativa do ar (Monteiro, 1995; Bardivieso *et al.*, 2015).

Dentre os meloeiros cultivados, há um crescente interesse pela produção de frutos tidos como “nobres”, conhecidos popularmente como melão japonês ou Cantaloupe, os quais são pertencentes aos melões rendilhados (*Cucumis melo* var. *reticulatus* Naud.) do grupo Cantalupensis. Estes melões possuem qualidades superiores quanto ao aroma, polpa com coloração diferenciada, maior teor de sólidos solúveis em

comparação aos melões tradicionais (Medeiros *et al.*, 2007).

A busca por produtos advindos de cultivos menos impactantes ao meio-ambiente também vem aumentando à medida que há possibilidade de disponibilizar informações de procedência aos consumidores. Estes optam por frutos produzidos com menor necessidade do uso de agrotóxicos e em sistema com maior eficiência na utilização da água e nutrientes. O ambiente protegido apresenta estas características em vantagem ao cultivo realizado diretamente em campo aberto, como a proteção contra fatores bióticos e abióticos (Chang *et al.*, 2013). No entanto, outras técnicas podem ser implantadas visando o melhor aproveitamento do espaço e dos recursos envolvidos.

Dentre as técnicas de cultivo, o adensamento no plantio pode ser utilizado como estratégia para otimizar o uso da terra e obter frutos com características apreciadas em diferentes mercados consumidores. Para minimelancias, foi observado menor desenvolvimento de plantas e frutos em sistemas de plantio adensado, o qual, no entanto, resultou em maiores produtividades por área cultivada (Campagnol *et al.*, 2016). Resultado similar foi obtido para três cultivares de melão, em sistema de cultivo protegido, em que a produção foi incrementada em 34,6% e a massa de frutos decresceu 11,4% pelo cultivo em 0,3 m entre plantas, em relação ao cultivo com espaçamento de 0,5 m (Bezerra *et al.*, 2009). Soma-se ao adensamento o cultivo de plantas verticalizadas, o qual traz uma série de benefícios como a facilitação do manejo de pragas e doenças (Martins *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2013), além de melhorar as qualidades físico-químicas dos frutos (Martins *et al.*, 1998) e a ergometria da atividade para o trabalhador rural.

Para melões rendilhados, deve-se levar em conta a preferência do consumidor em relação, principalmente, ao tamanho de frutos. Uma vez que, segundo Santos *et al.* (2015), são considerados comercializáveis frutos firmes, uniformes quanto à cor, com bom rendimento de casca, sem deformações, murchamento, rachaduras, sinais de podridão, ataques de insetos ou pragas e danos mecânicos.

O cultivo de novas áreas produtivas demanda informações quanto ao desenvolvimento da cultura e aos tratamentos que venham a aperfeiçoar o sistema de produção. Para tanto, neste trabalho objetivou-se estudar, o crescimento vegetativo, o potencial produtivo e a qualidade de frutos de meloeiro Cantaloupe em

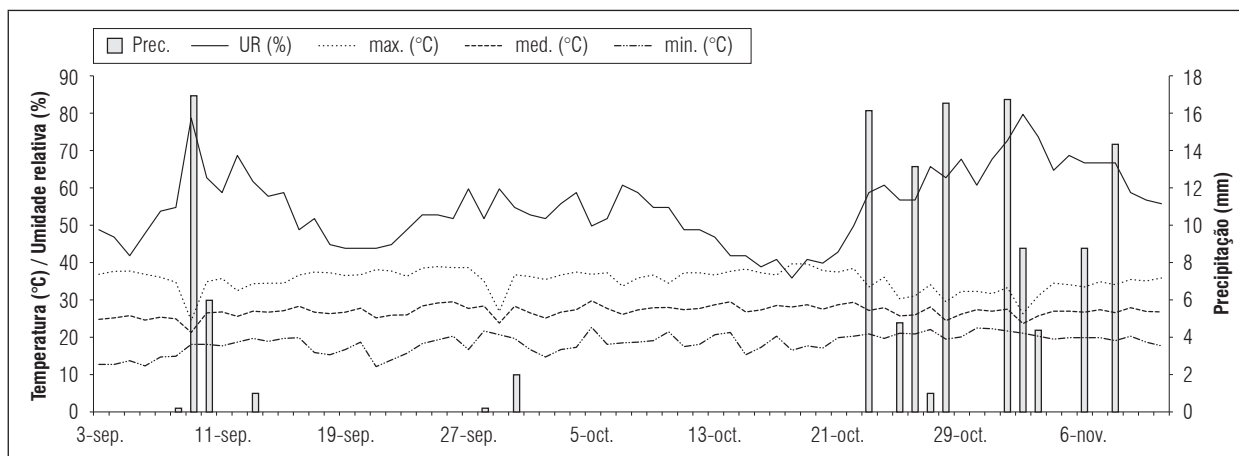
função da redução do espaçamento em dois ambientes de cultivo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido de setembro a novembro do ano de 2015, em Goiânia, Goiás, situado na região central do Brasil, 16°40' S and 49°15' W e altitude de 750 m. O local apresenta clima Aw, segundo classificação de Köppen-Geiger (Cardoso *et al.*, 2014), caracterizado por clima tropical com estação chuvosa de outubro a abril e um período com precipitações inferiores a 100 mm mensais entre maio a setembro. As temperaturas médias mensais variam de 20,8°C, nos meses de junho e julho, a 25,3°C no mês de outubro (Cardoso *et al.*, 2014). Os registros climáticos da temperatura e umidade do ar durante a condução do experimento foram obtidos a partir de estação climática localizada a 200 m do local dos ensaios (Fig. 1).

O solo da área experimental, nos dois ambientes de cultivo, foi classificado como Latossolo Vermelho (Santos *et al.*, 2013) e apresentou as seguintes características químicas, determinadas a partir da recomendação encontradas no manual de análises de solo (Donagemma *et al.*, 2011): M.O. = 0,7%; pH (CaCl<sub>2</sub>) = 4,6; P (Mehlich) = 3,5 mg dm<sup>-3</sup>; K = 131,0 mg dm<sup>-3</sup>; Ga = 2,0 cmolc dm<sup>-3</sup>; Mg = 0,81 cmolc dm<sup>-3</sup>; H+Al = 2,5 cmolc dm<sup>-3</sup>; Al = 0,0 cmolc dm<sup>-3</sup>; CTC = 5,6 cmolc dm<sup>-3</sup>; m% = 0,0; V% = 55,7.

O experimento foi delineado em blocos ao acaso em esquema fatorial 5×2, em que o primeiro fator corresponde aos cinco espaçamentos entre plantas (15, 25, 35, 45, 55 cm) e segundo fator aos dois ambientes de produção (protegido e campo aberto), com quatro repetições. Cada parcela foi constituída por uma linha de 3,5 m de comprimento. O ambiente protegido apresentava comprimento de 21 m, largura de 7 m, totalizando 147 m<sup>2</sup>, e altura de 4 m, coberto com filme plástico transparente e tela antiofídica branca nas laterais. O ambiente continha ainda duas aberturas nas extremidades, equivalentes ao arco superior. As mudas foram obtidas em bandejas de poliestireno expandido, a partir da semeadura em substrato turfoso comercial e húmus de minhoca (3:1) de sementes da cultivar Trinity (Takii Seed, Kyoto, Japão), no dia 21 de julho de 2015. Aos 35 d após a semeadura as mudas foram transplantadas para canteiros previamente preparados, com 20 cm de altura e 55 cm de largura, recobertos com mulching plástico de cor branca e distantes 80 cm entre si. O transplantio tardio (35 d)



**Figura 1. Condições climáticas de umidade relativa do ar, precipitação e temperatura máxima, média e mínima durante o período de condução do estudo.**

se deu por ocasião das baixas temperaturas na época em que as mudas foram produzidas, atrasando seu desenvolvimento.

A condução foi montada em sistema de espaldeira utilizando-se mourões de eucalipto que serviram como ponto de fixação dos arames tensionados sobre as linhas de plantio. O tutoramento das plantas de meloeiro e dos frutos foi feito por meio de fitilho amarrado ao arame tensionado a 2,5 m de altura. A irrigação foi realizada por meio de sistema de gotejamento. Para tanto foi utilizada uma mangueira por canteiro, está contendo gotejadores espaçados 20 cm entre si. Por meio deste sistema também foram realizadas as adubações de cobertura, via fertirrigação, aplicando-se 80 kg ha<sup>-1</sup> de N, na forma de ureia dissolvida, e 80 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, parcelados em duas épocas, aos 33 e aos 54 d após o plantio.

Trinta dias após o transplântio, foi avaliado o índice relativo de clorofila (SPAD), com clorofilômetro portátil (CFL1030; Falker, Porto Alegre-RS, Brasil), utilizando a terceira folha totalmente expandida, enquanto que a avaliação das demais características biométricas das plantas foi realizada aos 45 d após o transplântio, quando foram obtidos os valores de altura e número de entrenós das plantas. A partir desses valores foram obtidos os valores de velocidade de crescimento (cm d<sup>-1</sup>) e velocidade de emissão foliar (folhas/dia), pela razão entre a altura máxima e do número máximo de nós, respectivamente, pelo número de dias (45 d), de três plantas por parcela.

Ao final do ciclo, 63 d após o transplântio das mudas, foram avaliadas as características de produtividade e

qualidades físico-químicas de três frutos por parcela. Para tanto, foi observada a produtividade por metro quadrado, mensurados a massa fresca por pesagem em balança (W15, Welmy, Sta. Bárbara d'Oeste-SP, Brasil), a circunferência e o comprimento do fruto com fita métrica, espessura da casca e da polpa com paquímetro digital (Metrotools, São Paulo-SP, Brasil) e avaliadas as características químicas de sólidos solúveis por meio da leitura em refratômetro manual RTA-50 (Instrutherm, São Paulo-SP, Brasil), acidez titulável obtida pela titulação com solução de NaOH (1 M) e pela relação entre essas últimas duas variáveis foi obtida a relação entre sólidos solúveis e a acidez titulável (*ratio*). Também nesse momento obteve-se massa de matéria seca das mesmas três plantas por parcela. As plantas foram cortadas à altura do colo, colocadas em sacos de papel pardo e acondicionadas em estufa de ventilação forçada à temperatura de 70°C até a observação de massa constante e, posteriormente, pesada em balança digital (ML 600, Marte, São Paulo-SP, Brasil).

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias de ambientes pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), e realizando-se as análises de regressão para descrição dos efeitos dos espaçamentos. Para tanto utilizou-se o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2014).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as características biométricas e produtivas foram observadas diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) para os ambientes de cultivo e espaçamentos entre plantas

para todas as variáveis, excetuando-se o índice relativo de clorofila, para a qual não foram constatadas diferenças para espaçamento entre plantas (Tab. 1).

Foi observado que a velocidade de crescimento e a velocidade de emissão foliar foram maiores em plantas cultivadas ambiente protegido, quando comparadas às plantas cultivadas em campo aberto (Tab. 1). O ambiente protegido representa uma série de vantagens que favorece o desenvolvimento dos vegetais. Dentre as quais, a formação de um microclima com maior umidade, que diminui a evapotranspiração dos vegetais, a barreira física criada pelas telas laterais, que dificultam a entrada de insetos e a proteção contra o excesso de radiação solar (Chang *et al.*, 2013; Purquerio e Tivelli, 2006).

O aumento do espaçamento de plantio proporcionou maior velocidade de crescimento, até o ponto máximo estimado em 47,5 cm, no qual se obteve um crescimento diário de 3,87 cm. A variável velocidade de emissão foliar seguiu a mesma tendência, na qual foi constatado um ponto máximo de 53,75 cm entre plantas, com emissão de 0,61 folhas/dia (Tab. 1).

Para a massa de matéria seca de plantas, foi verificada resposta crescente ao aumento do espaçamento entre plantas, em que o maior acúmulo de matéria

seca coincidiu com o maior espaçamento. O mesmo comportamento foi observado para a variável massa fresca de frutos, verificando-se aumento em razão do aumento de espaçamento entre plantas (Tab. 1).

Esses resultados corroboram com as observações realizadas por Silva *et al.* (2010) ao estudar o efeito da densidade de plantio sobre o desenvolvimento de plantas de pimentão. Os autores verificaram que a diminuição da densidade de plantio resultou em maior desenvolvimento de plantas e frutos, atribuídos à menor competitividade entre os vegetais. Segundo Sangoi *et al.* (2002), a diminuição da competição entre plantas no ambiente, por nutrientes, água e radiação solar pode resultar em maior aporte de carbono e nitrogênio, favorecendo o desenvolvimento vegetativo.

Os valores do índice relativo de clorofila foram maiores em folhas de plantas cultivadas em ambiente protegido (Tab. 1). A elevação no índice relativo de clorofila pode ser explicada pela compensação realizada pelas plantas quanto ao sombreamento proveniente da cobertura plástica. Pois o maior teor de clorofila, principalmente da clorofila b, permite o aproveitamento de luz menos intensa, incrementando o desenvolvimento dos vegetais em ambientes sombreados (Whatley e Whatley, 1982).

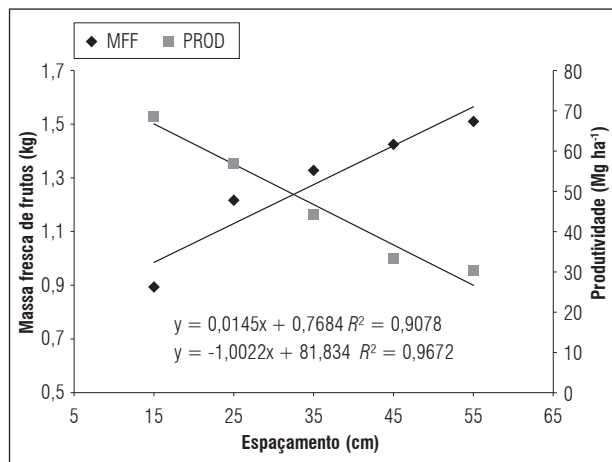
**Tabela 1. Médias de velocidade de crescimento (VC), velocidade de emissão foliar (VEF), matéria seca de plantas (MS), índice relativo de clorofila (IRC), massa fresca de frutos (MFF) e produtividade (PROD) para plantas de meloeiro cultivadas em diferentes ambientes e espaçamentos entre plantas. Goiânia- GO, 2015.**

Fatores de variação	VC	VEF	MS	IRC	MFF	PROD
	(cm d <sup>-1</sup> )	(Folhas/dia)	(g)	(SPAD)	(kg)	(kg m <sup>-2</sup> )
<b>Ambientes de cultivo</b>						
Protegido	4,38 a	0,67 a	44,66 a	64,85 a	1,33 a	4,77 a
Campo	3,10 b	0,51 b	42,04 a	56,27 b	1,23 a	4,58 a
<b>Espaçamento entre plantas</b>						
15	3,48	0,55	26,21	59,55	0,89	6,87
25	3,72	0,58	44,43	61,27	1,22	5,70
35	3,72	0,59	40,76	59,26	1,33	4,44
45	3,95	0,62	51,82	60,87	1,43	3,34
55	3,82	0,61	53,55	61,84	1,51	3,04
Regressão linear	NS	NS	*3	NS	*4	*5
Regressão quadrática	*1	*2	NS	NS	NS	NS
CV%	13,1	11,54	22,99	11,26	17,85	17,33

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. \*, NS: significativo a  $P \leq 0,05$  e não significativo, respectivamente.

<sup>1</sup>Y = -0,0004x<sup>2</sup> + 0,0344x + 3,0521 R<sup>2</sup> = 0,8521; <sup>2</sup>Y = -4E-05x<sup>2</sup> + 0,0043x + 0,4963 R<sup>2</sup> = 0,954; <sup>3</sup>Y = 0,6206x + 21,633 R<sup>2</sup> = 0,8068; <sup>4</sup>Y = 0,0145x + 0,7684 R<sup>2</sup> = 0,9078; <sup>5</sup>-1002,2x + 81835 R<sup>2</sup> = 0,9672.

A produtividade foi afetada negativamente com o aumento do espaçamento entre plantas, observando-se efeito decrescente (Fig. 2). Isso é devido ao menor número de plantas por área e, conseqüentemente, menor quantidade de frutos. Resultado semelhante foi observado para diferentes cultivares de melancia, em que maiores densidades de plantio favoreceram



**Figura 2.** Massa fresca de frutos e produtividade para plantas de meloeiro cultivadas em diferentes ambientes e espaçamentos entre plantas. Goiânia-GO, 2015.

o aumento da produtividade por área (Ramos *et al.*, 2009). Ao serem relacionadas, a produtividade e a massa fresca de frutos, obtém-se que o aumento da densidade de plantio resulta em maior quantidade de frutos de menor tamanho (Fig. 2). Resultados semelhantes foram obtidos para a cultura do meloeiro, em que plantas de três cultivares foram conduzidas em espaçamentos de 0,3 e 0,5 cm entre plantas, para o qual foi observado o efeito de elevação da massa dos frutos em maior espaçamento de plantio, enquanto que nessa mesma condição houve uma redução da produtividade (Bezerra *et al.*, 2009).

Assim como observado para as características biométricas vegetativas, houve diferenças para todas as variáveis físico-químicas, com exceção da circunferência e da acidez titulável, para os ambientes de cultivo. E para os espaçamentos entre plantas não foram observadas respostas para as características de espessura da casca, sólidos solúveis, acidez titulável e *ratio* (Tab. 2).

Para o comprimento e a circunferência dos frutos obteve-se resposta aos espaçamentos entre plantas. Os pontos de máximo foram obtidos nos espaçamentos de 49,95 e 47,51 cm, quando se observou valores de 15,10 e 44,00 cm de comprimento e circunferência, respectivamente. Resultados semelhantes foram

**Tabela 2.** Médias de espessura da casca (CASCA), espessura de polpa (POLPA), comprimento dos frutos (COMP), circunferência dos frutos (CIRC), sólidos solúveis (SS) e razão SS/acidez titulável (*ratio*) para frutos provenientes de plantas de meloeiro cultivadas em diferentes ambientes e espaçamentos entre plantas. Goiânia-GO, 2015.

Fatores de variação	Casca (mm)	Polpa (mm)	Comp (cm)	Circ (cm)	SS (°Brix)	Ratio -
<b>Ambientes de cultivo</b>						
Protegido	1,44 a	39,61 a	13,80 b	41,37 a	7,84 a	17,33 a
Campo	1,12 b	36,80 b	14,63 a	42,66 a	6,49 b	14,90 b
<b>Espaçamento entre plantas</b>						
15	1,23	34,35	12,49	37,47	7,03	16,89
25	1,33	37,22	14,11	42,11	7,10	16,23
35	1,19	38,96	14,78	43,34	7,17	16,12
45	1,28	39,32	14,51	42,80	7,23	16,00
55	1,37	41,16	15,18	44,35	7,30	15,89
Regressão linear	NS	*1	NS	NS	NS	NS
Regressão quadrática	NS	NS	*3	*4	NS	NS
CV%	20,34	10,59	10,62	8,14	15,36	20,75

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. \*, NS: significativo a  $P \leq 0,05$  e não significativo, respectivamente.

<sup>1</sup>Y = 0,1573x + 32,697 R<sup>2</sup> = 0,9367; <sup>2</sup>Y = 0,1886x + 33,142 R<sup>2</sup> = 0,9488; <sup>3</sup>Y = -0,002x<sup>2</sup> + 0,1998x + 10,11 R<sup>2</sup> = 0,9057;

<sup>4</sup>Y = -0,0057x<sup>2</sup> + 0,5416x + 31,139 R<sup>2</sup> = 0,8917.



obtidos para os cultivares Tânia (grupo amarelo), Gilat e Rita (grupo Cantaloupe), para os quais foi observado comprimento de frutos cultivados em espaçamento de 0,50 m entre plantas, em comparação a frutos cultivados em espaçamento de 0,30 m (Bezerra *et al.*, 2009) e para o cultivar Gold Pride (grupo Valenciano), verificando-se a queda linear do comprimento e da largura dos frutos a medida em que aumentou-se a densidade de plantas de 7.000 para 25.000 plantas/ha (Silva *et al.*, 2003). Os autores relacionam o efeito à competição entre plantas por nutrientes, água e luz.

Observou-se que os frutos produzidos em ambiente protegido apresentaram maiores espessuras de casca e polpa e menor comprimento de frutos. Este resultado indica que nestas condições há um melhor desenvolvimento da parte comestível dos frutos, melhorando seu aproveitamento. Também, o espessamento da casca é em fator determinante à manutenção da qualidade e prevenção contra danos mecânicos durante a fase de trânsito da fruta, englobando manuseio na colheita, embalagem e transporte (Queiroga *et al.*, 2013). Portanto, pode-se inferir que o ambiente protegido favorece a manutenção da qualidade do fruto durante as etapas pós-colheita.

Para as variáveis de sólidos solúveis e *ratio*, foi observada a melhora da qualidade dos frutos quando estes são provenientes de cultivo protegido. Uma das possíveis causas da menor qualidade físico-química dos frutos produzidos a campo seria a ocorrência de chuvas durante o período de enchimento e maturação. Mesmo com a utilização de *mulching*, o deslocamento lateral da água no solo pode ter reduzido o aproveitamento dos nutrientes advindos da fertirrigação, uma vez que nitrogênio e potássio são altamente móveis na solução do solo (Prado, 2008). Observa-se que esses nutrientes possuem alta influência sobre características como produção, espessura de polpa, sólidos solúveis e acidez titulável total (Silva *et al.*, 2014).

A região centro-oeste do Brasil apresenta características edafoclimáticas que possibilitam a produção de melões Cantaloupe. Observa-se que há necessidade de novos estudos quanto aos tratamentos culturais que possibilitem melhorias na qualidade dos frutos, tais como adubação e manejo da irrigação. A exploração de cultivos diferenciados é uma oportunidade para geração de diversificação da produção nas propriedades rurais, incremento da renda e geração de empregos no meio rural pela necessidade de mão-de-obra.

Desta maneira, o melão Cantaloupe pode ser uma opção rentável ao produtor rural (Vendruscolo *et al.*, 2017b). Também os resultados obtidos no presente estudo podem ser utilizados para a melhoria da qualidade dos frutos, levando-se em consideração o cultivo em ambiente protegido e utilizando-se do espaçamento para a exploração de diferentes mercados, com diferentes demandas quanto ao tamanho dos frutos.

## CONCLUSÕES

O cultivo em ambiente protegido melhora as características biométricas e produtivas das plantas de meloeiro Cantaloupe.

Maiores espaçamentos entre plantas propiciam o aumento do tamanho dos frutos, sem afetar a qualidade dos mesmos.

O espaçamento entre plantas de 45 a 55 cm em condições de cultivo semelhantes às observadas no estudo é o mais indicado para a cultura do meloeiro Cantaloupe.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado ao primeiro autor.

**Conflito de interesses:** o manuscrito foi preparado e revisado com a participação de todos os autores, que declaram não ter qualquer conflito de interesses que possa afetar a validade dos resultados do trabalho apresentado.

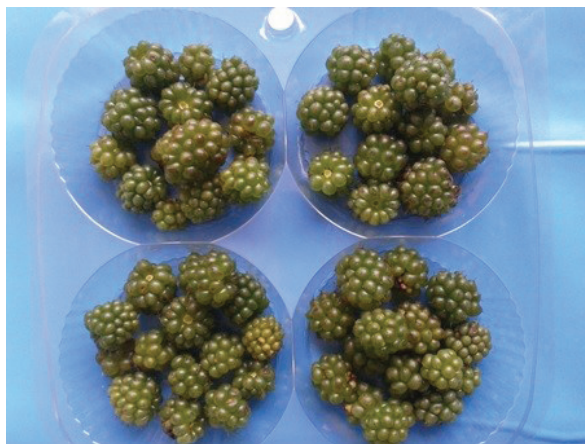
## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bardivieso, D.M., W.I. Maruyama, L.E. Pessato, A.C.B. Pereira e J.H. Modesto. 2015. Adubação potássica na produção de duas cultivares de meloeiro. *Rev. Agric. Neotrop.* 2(1), 32-40.
- Bezerra, F.M.L., M.D.C.H. Nunes, C.A.S. Freitas e F.L. Silva. 2009. Desempenho de três híbridos de meloeiro sob dois espaçamentos em ambiente protegido na Chapada do Apodi. *Rev. Ciênc. Agron.* 40(3), 412-416.
- Campagnol, R., R.T. Matsuzaki e S.C. Mello. 2016. Condução vertical e densidade de plantas de minimelancia em ambiente protegido. *Hortic. Bras.* 34(1), 137-143. Doi: 10.1590/S0102-053620160000100021

- Cardoso, M.R.D., F.F.N. Marcuzzo e J.R. Barros. 2014. Classificação climática de Köppen-Geiger para o estado de Goiás e o Distrito Federal. *Acta Geog.* 8(16), 40-55.
- Chang, J., X. Wu, Y. Wang, L.A. Meyerson, B. Gu, Y. Min, H. Xue, C. Peng e Y. Ge. 2013. Does growing vegetables in plastic greenhouses enhance regional ecosystem services beyond the food supply? *Front. Ecol. Environ.* 11(1), 43-49. Doi: 10.1890/100223
- Donagemma G.K., V.D.B. Campos, S.B. Calderano, W.G. Teixeira e J.H.M. Viana. 2011. Manual de métodos de análise de solo. 2ª ed. Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Rio de Janeiro, Brasil.
- Ferreira, D.F. 2014. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciênc. Agrotecnol.* 38(2), 109-112. Doi: 10.1590/S1413-70542014000200001
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2015. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Em: [www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br); acessado: Fevereiro de 2016.
- Martins, S.R., H.S. Fernandes, F.N. Assis e M.E.G. Mendez. 1999. Caracterização climática e manejo de ambientes protegidos: a experiência brasileira. *Inf. Agrop.* 20(1), 15-23.
- Martins, S.R., R.M. Peil, J.E. Schwengber, F.N. Assis e M.E.G. Mendez. 1998. Produção de melão em função de diferentes sistemas de condução de plantas em ambiente protegido. *Hortic. Bras.* 16(1), 24-30.
- Medeiros, J.D., S.C.L. Santos, M.J.T. Câmara e M.Z.D. Negreiros. 2007. Produção de melão Cantaloupe influenciado por coberturas do solo, agrotêxtil e lâminas de irrigação. *Hortic. Bras.* 25(4), 538-543. Doi: 10.1590/S0102-05362007000400009
- Monteiro, S.B. 1995. Irrigação por gotejamento na cultura do melão em estufa e seu efeito a produção. Tese de mestrado. Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.
- Prado, R.D.M. 2008. Nutrição de plantas. Editora UNESP, Jaboticabal, Brasil.
- Purquerio, L.F.V. e S.W. Tivelli. 2006. Manejo do ambiente em cultivo protegido. Manual técnico de orientação: projeto hortalimento. Codeagro, São Paulo, Brasil.
- Queiroga, F.M.D., J. Novo Junior, S.Â.D.D. Costa, F.D.S. Oliveira Filho, F.H.F. Pereira, A.L.D. Souza Filho e P.B. Maracaja. 2013. Produção e qualidade de frutos de melão Harper em função de doses de boro. *Agrop. Cient. Semi.* 9(3), 87-93. Doi: 10.30969/acsa.v9i3.377
- Ramos, A.R., R.D.C.S. Dias e C.A. Aragão. 2009. Densidades de plantio na produtividade e qualidade de frutos de melancia. *Hortic. Bras.* 27(4), 560-564. Doi: 10.1590/S0102-05362009000400026
- Santos, F.G.B., M.Z. Negreiros, J.F. Medeiros, G.H.S. Nunes, D.C. Medeiros e L.C. Grangeiro. 2015. Produção e qualidade de melão Cantaloupe em cultivo protegido temporariamente com agrotêxtil em Mossoró, Rio Grande do Norte. *Rev. Ceres* 62(1), 93-100. Doi: 10.1590/0034-737X201562010012
- Santos H.G., P.K.T. Jacomine, L.H.C. Anjos, V.A. Oliveira, J.F. Lumbreiras, M.R. Coelho, J.A. Almeida, T.J.F. Cunha e J.B. Oliveira. 2013. Sistema brasileiro de classificação de solos. 3ª ed. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, Brasil.
- Sangoi, L., M.A. Gracietti, C. Rampazzo e P. Bianchetti. 2002. Response of brazilian maize hybrids from different eras to changes in plant density. *Field Crops Res.* 79(1), 39-51. Doi: 10.1016/S0378-4290(02)00124-7
- Silva, M.D.C., T. Silva, E.M. Bonfim-Silva e N. Lorraine. 2014. Características produtivas e qualitativas de melão rendilhado adubado com nitrogênio e potássio. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.* 18(6), 581-587. Doi: 10.1590/S1415-43662014000600003
- Silva, I.B., M.Z. Negreiros, K. Kalliany, C.F. Moura, F.C.L. Freitas, G.H.S. Nunes, P.S.L. Silva e L.C. Grangeiro. 2010. Crescimento de pimentão em diferentes arranjos espaciais. *Pesq. Agrop. Bras.* 45(2), 132-139. Doi: 10.1590/S0100-204X2010000200003
- Silva, D.P., J.D. Fonseca, J.C.A. Mota e J.D. Silva. 2003. Densidade de plantio e rendimento de frutos do meloero (*Cucumis melo* L.). *Rev. Bras. Frutic.* 25(2), 245-247. Doi: 10.1590/S0100-29452003000200015
- Vendruscolo, E.P., R.S. Rabelo, L.F.C. Campos, A.P.B. Martins, L.R. Semensato e A. Seleguini. 2017a. Alterações físico-químicas em frutos de melão rendilhado sob aplicação de bioestimulante. *Rev. Colomb. Cienc. Hortic.* 11(2), 459-463. Doi: 10.17584/rcch.2017v11i2.7413
- Vendruscolo, E.P., L.F.C. Campos, A. Seleguini, A.P.B. Martins e S.F.D. Lima. 2017b. Economic viability of muskmelon cultivation in different planting spacing in Brazil central region. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* 70(3), 8319-8325. Doi: 10.15446/rfna.v70n3.62656
- Whatley, J.M. e F.R. Whatley. 1982. A luz e a vida das plantas. EDUSP, São Paulo, Brasil.

# Micropropagation protocol for the wild Brazilian greenberry (*Rubus erythroclados*)

Protocolo de micropropagación de mora-verde (*Rubus erythroclados*) nativa del Brasil



PAULO MAURICIO CENTENARO BUENO<sup>1, 2, 3</sup>  
LUIZ ANTONIO BIASI<sup>2</sup>  
MAURO BRASIL DIAS TOFANELLI<sup>2</sup>

**Fruits of the wild Brazilian greenberry.**

Foto: L.A. Biasi

## ABSTRACT

This study presents the first micropropagation protocol for greenberry (*Rubus erythroclados*), a wild Brazilian species with edible green fruits. In the *in vitro* multiplication stage, three concentrations of benzyladenine (BA) were tested (0, 5 and 10  $\mu\text{M}$ ), combined with three concentrations of indolebutyric acid (IBA) (0, 3 and 6  $\mu\text{M}$ ) in two subsequent subcultures. In the rooting stage, *in* and *ex vitro* rooting were compared after pulse treatment of the microcutting for 10 seconds in IBA (0, 2.46, 4.92 and 7.38 mM). For the *in vitro* trial, the microcuttings were maintained in glass bottles with an MS medium under controlled conditions inside a growth room. For the *ex vitro* trial, the microcuttings were planted in styrofoam containers with vermiculite and maintained inside a greenhouse with an intermittent mist system. *R. erythroclados* multiplication was obtained with the addition of BA to the culture medium, while IBA reduced the shoot proliferation and increased mortality. The *ex vitro* rooting showed the best results, reaching 95.8% for rooted and acclimatized plants without IBA. An efficient and simple protocol can be used for *R. erythroclados* micropropagation with 5  $\mu\text{M}$  BA for *in vitro* shoot proliferation and *ex vitro* rooting of microcuttings with intermittent misting.

**Additional keywords:** native species, tissue culture, rooting, microcutting, explant, growth regulators.

<sup>1</sup> Campus Palmas, Instituto Federal do Paraná, Palmas-PR (Brazil). ORCID Bueno, P.M.C.: 0000-0002-6066-9131

<sup>2</sup> Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR (Brazil). ORCID Biasi, L.A.: 0000-0002-3479-8925; ORCID Tofanelli, M.B.D.: 0000-0002-1831-3326

<sup>3</sup> Corresponding author. paulo.bueno@ifpr.edu.br



## RESUMEN

El presente trabajo presenta el primer protocolo de micropropagación de morera verde (*Rubus erythroclados*), una especie fructífera nativa de Brasil. En la fase de multiplicación *in vitro*, se probaron tres concentraciones de benziladenina (BA) (0, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) combinadas con tres concentraciones de ácido indolbutírico (IBA) (0, 3 y 6  $\mu\text{M}$ ) en dos cultivos subsiguientes. En la etapa de enraizamiento, el enraizamiento *in* y *ex vitro* fue comparado después del tratamiento de inmersión rápida de las microestacas durante 10 segundos en solución de IBA (0; 2,46; 4,92 y 7,38 mM). Para el experimento *in vitro*, las microestacas se mantuvieron en recipientes de vidrio con medio de cultivo MS en una sala de crecimiento con condiciones de temperaturas controladas. Para el experimento *ex vitro*, las microestacas fueron plantadas en bandejas de poliestireno expandido con vermiculita, y se mantuvieron en una casa de vegetación con sistema de nebulización intermitente. La multiplicación de *R. erythroclados* fue obtenida con la adición de BA en el medio de cultivo, mientras que IBA redujo la emisión de brotes y aumentó la mortalidad de explantes. El enraizamiento *ex vitro* mostró los mejores resultados, llegando al 95,8% de microestacas enraizadas y aclimatadas sin tratamiento con IBA. Un protocolo simple y eficiente puede ser utilizado para la micropropagación de *R. erythroclados* con 5  $\mu\text{M}$  de BA para multiplicación *in vitro* y enraizamiento de microestacas *ex vitro* en sistema de nebulización intermitente.

**Palabras clave adicionales:** especie nativa, cultivo de tejidos, enraizamiento, microestaca, explante, reguladores de crecimiento. regulators.

Received for publication: 20-12-2017 Accepted for publication: 30-05-2018

## INTRODUCTION

The greenberry (*Rubus erythroclados*) is a native plant from grassy regions and rain forests in southern Brazil (Cordeiro *et al.*, 2011). Its green fruits (Fig. 1A and 1B), with high sugar levels and a pleasant taste, drew the attention of the local population, revealing their marketing potential alongside other small fruits. However, the cuttings of this species are difficult to root, and there is a lack of published studies on its propagation; so, this *in vitro* research was carried out.

Blackberry plants (*Rubus* spp.) can be propagated with root cuttings, stem cuttings (Maia and Botelho, 2008; Campagnolo and Pio, 2012) and tissue cultures (Pasa *et al.*, 2012), of which tissue cultures are the surest way to avoid contamination by fungi, bacteria, viruses and nematodes in addition to resulting in genetically uniform plants in a short period of time. However, the great variability in the *in vitro* behavior requires us to develop specific growing conditions since not all *Rubus* species have a high potential for *in vitro* propagation (Debnath, 2003). For each species and cultivar, there is a specific culture medium, and, to determine which is the best, several tests should be performed.

The plant growth regulators used in blackberry tissue cultures include benzyladenine (BA) and indolebutyric acid (IBA) (Lazic and Ruzic, 2007). The rooting of microcuttings can either be performed *in vitro*, as is already widely used (Deng and Donnelly, 1993) or *ex vitro* during acclimatization, directly on the substrate (Jin *et al.*, 1992; Augusto *et al.*, 2006) or in float hydroculture (Clapa *et al.*, 2013). *Ex vitro* rooting offers the advantage of reducing difficulties related to survival and development of plants cultivated *in vitro* (Augusto *et al.*, 2006; Pelizza *et al.*, 2013) and also reduces costs.

The aim of this study was to establish a useful and simple greenberry micropropagation protocol with satisfactory multiplication, rooting and acclimatization rates.

## MATERIAL AND METHODS

The initial explants were collected from mother plants growing into a greenhouse (Fig. 1C). Nodal segments (Fig. 1D) from new shoots were disinfected and established *in vitro*. The explants for this



study were derived from the multiplication stage after three subcultures *in vitro* with 5  $\mu\text{M}$  BA, and, to completely eliminate the effects of this growth regulator, the explants were submitted to two subcultures in an MS medium free of plant growth regulators. Each explant was composed of a lateral bud with a pair of leaves. The plants were maintained in a growth room at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  with a 16-h photoperiod and 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  irradiance provided by cool-white fluorescent bulbs.

An MS culture medium was used (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 30  $\text{g L}^{-1}$  sucrose. The pH of the solution was adjusted to 5.8 using 0.1 N sodium hydroxide before the addition of 6  $\text{g L}^{-1}$  agar and sterilization with autoclaving at  $120^\circ\text{C}$  and a pressure of 1.5 atm for 20 min. 30 mL of the culture medium were placed in glass bottles, which were sealed with a polypropylene cap and plastic film.

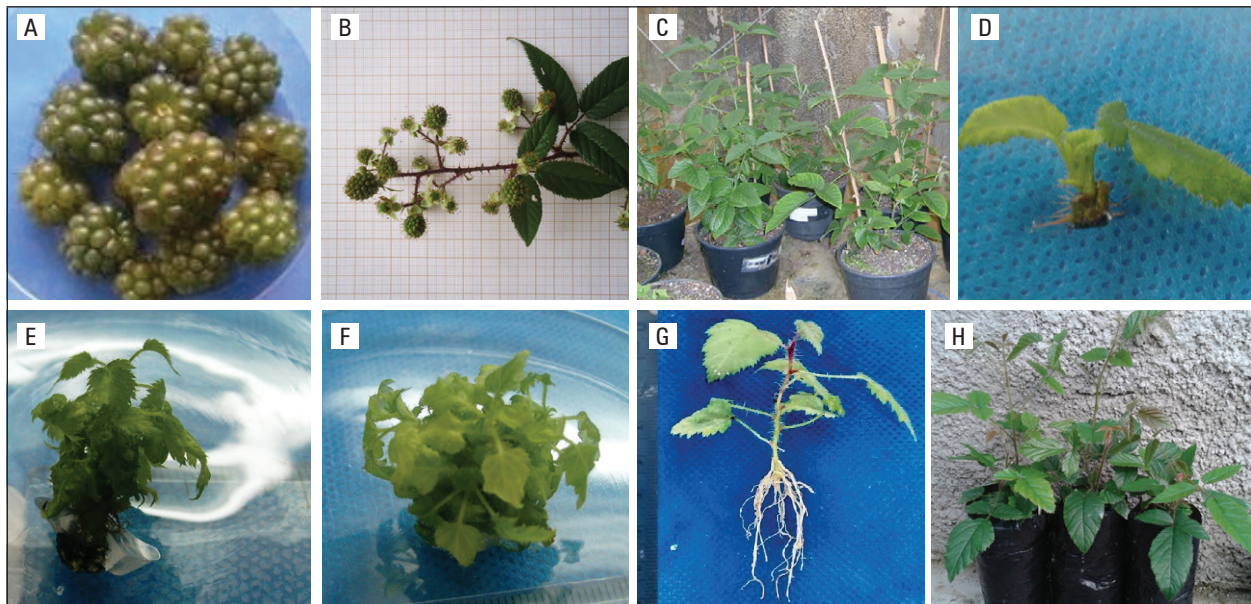
In the trial for multiplication, the experiment design was completely randomized in a factorial arrangement ( $3 \times 3$ ), with three IBA concentrations (0, 3 and 6  $\mu\text{M}$ ), three BA concentrations (0, 5 and 10  $\mu\text{M}$ ), four replications, 12 plants per experiment plot, and six microcuttings per bottle. This experiment was evaluated for two subcultures, and the explants of each treatment were used in the following treatment after 2 months of culture.

The analyzed parameters included the number of new shoots per explant with at least 0.3 cm, the largest shoot height, the number of new leaves per shoot and roots per explant, the percentage of dead explants, the hyperhydricity, the explants with callus formation, and the rooted explants.

The rooting trials were conducted with a completely randomized design in a factorial arrangement ( $4 \times 2$ ), with four IBA concentrations (0, 2.46, 4.92 and 7.38 mM), two environments (*in* and *ex vitro*), four replications and 12 plants per experiment plot. The culture medium and growth room for the *in vitro* conditions were the same as those used in the multiplication trial. For the *ex vitro* rooting, microcuttings were placed in styrofoam containers with vermiculite in a greenhouse with an intermittent mist system.

For these trials, the microcuttings were cultivated in a culture medium containing 5  $\mu\text{M}$  BA, and, to eliminate the effects of the plant growth regulator, they were submitted to two subcultures with an MS medium free of plant growth regulators.

Each microcutting was held with four leaves and about 1 cm in height. The base of each microcutting was placed into the respective IBA solution for ten seconds and then placed *in vitro* or *ex vitro*. The IBA



**Figure 1.** Aspects of *Rubus erythroclados*. A. Ripe fruits; B. Branch with apical inflorescences and immature fruits; C. Mother plants in a greenhouse; D. Nodal segment with new shoot *in vitro*; E. Shoot proliferation in the first subculture with 5  $\mu\text{M}$  BA; F. Shoot proliferation in the second subculture with 5  $\mu\text{M}$  BA; G. Plant rooted *ex vitro* without a growth regulator; H. Acclimatized plants.



was diluted with two different methods using an ethanol solution (50% v/v) and some drops of 1 N NaOH. The solution pH was adjusted to 7.0 in both methods.

These trials were evaluated after 69 d, and the following parameters were analyzed: percentage of rooted microcuttings, dead microcuttings, and microcuttings with a callus (including those rooted), number of roots and leaves per plant, length of the largest root, and plant growth.

The data were submitted to Bartlett's test to check for homogeneity in the variances and analyzed following Analysis of Variance (ANOVA). The means were compared by using the Tukey test with Sisvar<sup>®</sup> statistical program. The differences between the means were significant with a probability of  $P \leq 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

### Multiplication

The use of 5  $\mu\text{M}$  BA was sufficient to obtain one of the higher multiplication rates (Fig. 1E and 1F), 4.6 and 4.1 for first and second subculture, respectively, without a statistical difference ( $P > 0.05$ ) from 10  $\mu\text{M}$  BA. Whereas, in its absence, multiplication did not occur. The use of IBA is dispensable for multiplication although its presence significantly decreases hyperhydricity. These responses were observed in either the first (Tab. 1) and second subculture (Tab. 2). Debnath (2004) also observed only one shoot formation per explant in a culture medium free of cytokines when multiplying the dwarf raspberry (*Rubus pubescens*); this number increased with the addition of BA. Erig *et al.* (2002) reported that 5.1  $\mu\text{M}$  BA promoted the highest multiplication rate of blackberry cv. Tupy, which can be multiplied *in vitro* without the addition of IBA in the culture medium, as observed in this study. A commercial micropropagation protocol using 3.56  $\mu\text{M}$  BA obtained an average multiplication rate of 6.2 shoots per explant with seven blackberries cultivars in six subcultures (Oliveira *et al.*, 2008), and, in a similar protocol with the same BA concentration for four raspberry cultivars, the average multiplication rate was 4.6 (Oliveira and Nino, 2009).

The concentration of 5  $\mu\text{M}$  BA also provided the greatest shoot growth in both subcultures (Tab. 1 and 2). However, this plant growth regulator did not

influence the number of leaves formed by shoots in the first subculture alone; the response was different in the second one, where the absence of the regulator did not allow for the formation of new shoots. For the 'Xavante' blackberry, 3.56  $\mu\text{M}$  BA promoted the number of leaves and the height of the shoots (Pasa *et al.*, 2012).

The absence of growth regulators, as well the presence of BA alone, did not induce callus formation, but, when the culture medium was supplemented with IBA, there was a high callus percentage considering the first subculture (Tab. 1). However, in the second subculture, there was no callus formation in any of the treatments. In a study with 32 different *Rubus* genotypes that tested BA, zeatin, and kinetin for micropropagation, it was found that both kinetin and zeatin induced callus formation, but failed to promote shoot multiplication or shoot elongation. BA was effective in the promotion of shoot development across the wide range of genotypes used in this study. The lower concentration of BA (4.4  $\mu\text{M}$ ) worked for most hybrid berries, boysenberries (*R. idaeus*  $\times$  *R. ursinus*), some raspberries (*R. idaeus*) and blackberries during *in vitro* propagation trials. Tripling the BA concentration (13.31  $\mu\text{M}$ ) promoted shoot development in the more recalcitrant *Rubus* cultivars and selections (Wu *et al.*, 2009). This concentration, 4.4  $\mu\text{M}$  BA, was also the best one for multiplication of blackberry (*R. glaucos*), with 7.5 shoots per explant (Sigarroa-Rieche and García-Delgado, 2011).

In a trial with BA, 2iP and zeatin, it was also observed that a culture medium supplemented with BA was better for the multiplication of 'Xavante' blackberry and 'Batum' raspberry with 13 and 12  $\mu\text{M}$ , respectively, but, for improving the shoot height, zeatin and 2iP were more efficient (Leitzke *et al.*, 2010).

There was no hyperhydricity when the medium culture was free of growth regulators or when it was supplemented with only IBA. When BA was used alone, the hyperhydricity was very high, more than 81% in the first subculture (Tab. 1). This problem was drastically reduced with the increased IBA concentration. In the second subculture, the effect of BA was decreased by half, but was still observable (Tab. 2). This reduction may have occurred because the better plants were selected for the second subculture. Moreover, Oliveira *et al.* (2008) observed that hyperhydricity increased in every subculture in seven cultivars of blackberry for six subcultures.

**Table 1.** Number of shoots, greater shoot height, leaves per shoot, percentage of explants with callus formation, hyperhydricity, rooting, mortality, and number of roots of *Rubus erythroclados* explants treated with different concentrations of IBA and BA in the first subculture.

IBA ( $\mu\text{M}$ )	BA ( $\mu\text{M}$ )			
	0	5	10	
<b>Shoots per explant</b>				
0	1.0 aB	4.6 aA	5.6 aA	
3	0.2 bB	2.7 abA	3.2 bA	
6	1.0 aA	1.6 bA	1.0 cA	
CV (%)	20.2			
<b>Height of the greatest shoot (cm)</b>				
0	0.5 aB	0.7 aA	0.5 abB	
3	0.0 bB	0.8 aA	0.7 aA	
6	0.4 aB	0.7 aA	0.3 bB	
CV (%)	6.11			
<b>Number of leaves per shoot</b>				
0	1.8 aA	1.9 aA	1.8 aA	
3	0.4 bB	1.9 aA	1.9 aA	
6	1.6 aA	1.9 aA	1.4 aA	
CV (%)	19.2			
<b>Explants with callus (%)</b>				
0	0.0 bA	0.0 cA	0.0 bA	
3	0.0 bB	41.7 bA	62.5 aA	
6	29.2 aB	93.7 aA	6.2 bC	
CV (%)	32.21			
<b>Hyperhydricity (%)</b>				
0	0.0 aB	91.7 aA	81.2 aA	
3	0.0 aB	29.2 bA	43.7 bA	
6	0.0 aB	10.4 cA	0.0 cB	
CV (%)	19.8			
<b>Rooting (%)</b>				
0	22.9 bA	0.0 aB	2.1 bB	
3	68.7 aA	0.0 aB	0.0 bB	
6	35.4 bA	0.0 aB	50.0 aA	
CV (%)	34.4			
<b>Number of roots per explant</b>				
0	1.3 bA	0.0 aB	0.5 bB	
3	4.2 aA	0.0 aB	0.0 bB	
6	5.2 aA	0.0 aB	4.3 aA	
CV (%)	15.7			
<b>Mortality (%)</b>				<b>Average</b>
0	52.1	8.3	14.6	25.0 b
3	31.2	18.7	31.2	27.1 ab
6	64.6	27.1	41.7	44.4 a
Average	49.3 A	18.1 B	29.2 B	
CV (%)	39.4			

Means followed by the same lower case letter in the column and capital letter in the row do not differ statistically according to the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ).

**Table 2.** Number of shoots, greater shoot height (cm), leaves per shoot, percentage of explants with callus formation, hyperhydricity, rooting, mortality, and number of roots of *Rubus erythroclados* explants treated with different concentrations of IBA and BA in the second subculture.

IBA ( $\mu\text{M}$ )	BA ( $\mu\text{M}$ )			
	0	5	10	
Shoots per explant				
0	0.0 aC	4.1 aA	1.7 aB	
3	0.0 aB	2.5 abA	3.2 aA	
6	0.0 aB	1.3 bA	0.0 bB	
CV (%)	22.7			
Height of the greatest shoot (cm)				
0	0.0 aB	1.1 aA	0.7 aA	
3	0.0 aB	0.8 abA	0.9 aA	
6	0.0 aB	0.6 bA	0.0 bB	
CV (%)	11.3			
Number of leaves per shoot				
0	0.0 aB	4.8 abA	4.0 aA	
3	0.0 aB	5.4 aA	5.7 aA	
6	0.0 aB	3.4 bA	0.0 bB	
CV (%)	19.8			
Explants with callus (%)				
0	0.0	0.0	0.0	
3	0.0	7.5	0.0	
6	0.0	0.0	0.0	
CV (%)	95.0			
Hyperhydricity (%)				
0	0.0 aB	35.4 aA	43.7 aA	
3	0.0 aB	14.6 aB	50.0 aA	
6	0.0 aA	8.3 aA	0.0 bA	
CV (%)	62.3			
Rooting (%)				
0	0.0 bA	0.0 aA	0.0 aA	
3	8.5 aA	0.0 aB	0.0 aB	
6	0.0 bA	0.0 aA	0.0 aA	
CV (%)	2.3			
Number of roots per explant				
0	0.0 bA	0.0 aA	0.0 aA	
3	4.0 aA	0.0 aB	0.0 aB	
6	0.0 bA	0.0 aA	0.0 aA	
CV (%)	14.0			
Mortality (%)				Average
0	100.0	33.3	56.2	63.2 ab
3	91.5	25.2	33.3	50.0 b
6	100.0	60.4	100.0	86.8 a
Average	97.2 A	39.6 B	63.2 B	
CV (%)	31.97			

Means followed by the same lower case letter in the column and capital letter in the row do not differ statistically according to the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ).

The concentration of 3  $\mu\text{M}$  IBA when used alone provided the highest percentage of rooting (68.7%) in the first subculture (Tab. 1). This concentration also provided one of the greater number of roots per explant, around 4, in both subcultures (Tab. 1 and 2). In the second subculture, rooting was absent; with only 3  $\mu\text{M}$  IBA, few rooted plants were found. The mortality was higher in the second subculture, mainly with the treatments without BA, where almost all of the explants died (Tab. 2). The beneficial effects of BA may be due to the fact that cytokinins promote cell division, elongation and differentiation and are also responsible for delaying the senescence of plants (Taiz and Zeiger, 2013).

The increased mortality and decreased rooting in the second subculture may be related to the nutritional requirements of this species. In a future phase, the optimization of the mineral composition of the culture medium should be studied to improve the growth of *R. erythroclados*. High quality shoots were obtained for red raspberry with higher concentrations of  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ , and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in an MS medium (Poothong and Reed, 2015).

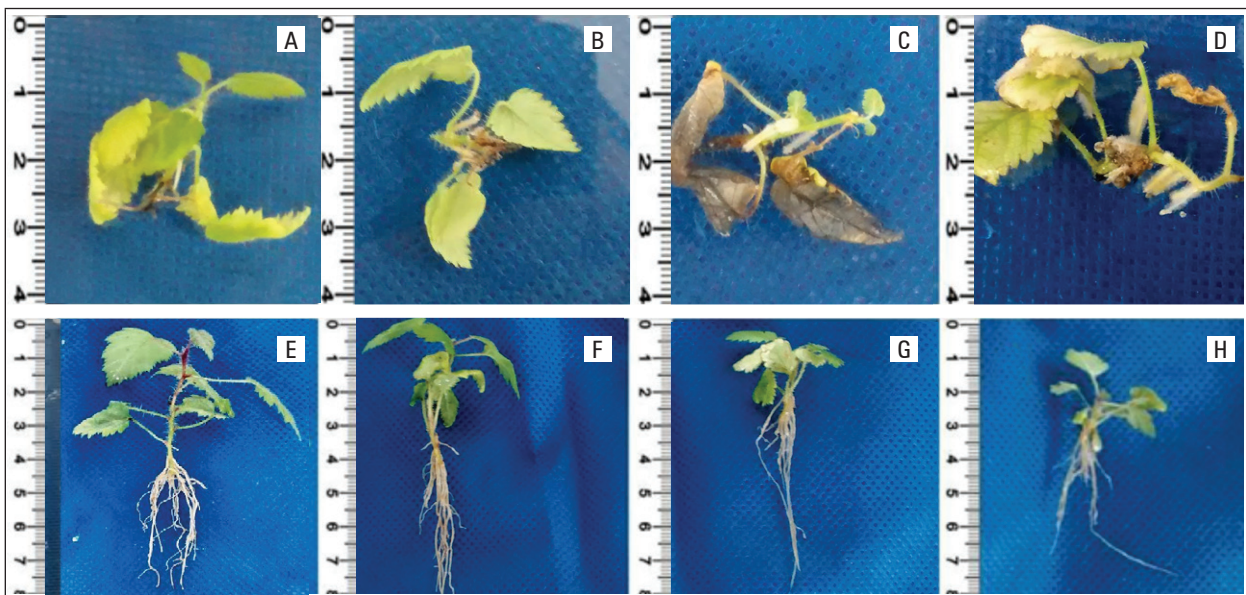
## Rooting

The *ex vitro* rooting of *R. erythroclados* (Fig. 2E, 2F, 2G and 2H) was more efficient when compared to the *in vitro*

rooting (Fig. 2A, 2B, 2C and 2D). High rooting percentages were found in the control without IBA, 89.6 and 95.8% (Tab. 3 and 4). The percentage of rooted plants increased with the *in vitro* IBA treatment, but achieved less than half with the *ex vitro* rates. In this case, when IBA was diluted in ethanol, the use of higher concentrations decreased the rooting percentage (Tab. 3), and, when it was diluted in NaOH, the concentrations did not differ (Tab. 4). The dilution of IBA in NaOH or ethanol did not present differences in the cutting propagation of olives (Oliveira *et al.*, 2009).

The mortality of the microcuttings was significantly lower when the cuttings were placed on the environment *ex vitro*, only 2.1 and 6.2% in the control of both trials (Tab. 3 and 4). It was observed that the mortality of the microcuttings increased with the IBA concentration when this growth regulator was diluted in ethanol with 4.92 and 7.38 mM (Tab. 3).

Callus formation was not observed in any *ex vitro* plant as observed with blackberry after five minutes of immersion and *ex vitro* rooting (Pelizza *et al.*, 2013). The callus formation reached 58.3% *in vitro* with IBA diluted in ethanol (Tab. 3), but only 4.2% when IBA was diluted in NaOH. This result could indicate that the salts that make up the culture medium may affect cell differentiation and change the morphogenetic



**Figure 2.** Aspect of *Rubus erythroclados* microcuttings under different IBA pulse treatments diluted in NaOH. A, B, C, D: cultivated *in vitro* and treated with 0, 2.46, 4.92 and 7.38 mM IBA, respectively. E, F, G, H: cultivated *ex vitro* and treated with 0, 2.46, 4.92 and 7.38 mM IBA, respectively.

**Table 3.** Rooting, length of the highest root, number of leaves per plant, mortality, percentage of callus formation, number of roots per microcutting, growth and number of leaves per *Rubus erythroclados* plant treated with different concentrations of IBA diluted in ethanol (50% v/v) and placed *in* and *ex vitro*.

	IBA (mM)				
	0	2.46	4.92	7.38	
	Rooting (%) <sup>(1)</sup>				
<i>In vitro</i>	0.0 bC	41.7 bA	14.6 bB	39.6 aA	
<i>Ex vitro</i>	95.8 aA	89.6 aAB	64.6 aB	39.6 aC	
CV (%)	11.9				
	Largest root length (cm)				
<i>In vitro</i>	0.0 bB	0.6 bA	0.5 bA	0.5 bA	
<i>Ex vitro</i>	3.1 aAB	3.3 aA	2.7 aAB	2.4 aB	
CV (%)	7.1				
	Mortality (%)				
<i>In vitro</i>	89.6 aA	39.6 aC	77.1 aAB	47.9 aBC	
<i>Ex vitro</i>	2.1 bB	8.3 bB	35.4 bA	58.3 aA	
CV (%)	16.8				
	Callus formation (%)				
<i>In vitro</i>	0.0 aC	58.3 aA	22.9 aB	52.1 aA	
<i>Ex vitro</i>	0.0 aA	0.0 bA	0.0 bA	0.0 bA	
CV (%)	32.9				
	Roots per microcutting				Average
<i>In vitro</i>	0.0	4.5	5.2	4.2	3.5 b
<i>Ex vitro</i>	4.6	12.5	7.9	10.7	8.9 a
Average	2.3 B	8.5 A	6.5 A	7.4 A	
CV (%)	25.4				
	Plant growth (cm)				Average
<i>In vitro</i>	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1 b
<i>Ex vitro</i>	0.8	0.6	0.2	0.3	0.5 a
Average	0.4 A	0.4 A	0.1 A	0.1 A	
CV (%)	13.8				
	Leaves per plant				Average
<i>In vitro</i>	1.2	0.5	0.1	0.0	0.4 b
<i>Ex vitro</i>	3.1	1.4	0.7	0.2	1.3 a
Average	2.1 A	0.9 B	0.4 BC	0.1 C	
CV (%)	19.6				

Means followed by the same lower case letter in the column and capital letter in the row do not differ statistically according to the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ).

route, leading to higher callus formation than *in vitro* roots. Leitzke *et al.* (2009) observed that the MS medium provided a lower rooting rate and lower number and length of roots than WPM with in 'Xavante' blackberry. Welander (1985), Del Castillo and Zerda (1990) obtained 100% *Rubus* spp. rooting *in vitro* by removing 1/5 of the MS macronutrients and adding 0.05  $\mu$ M IBA. Other auxins should be tested, such as naphthalene acetic acid (NAA), which showed good results for blackberries (Villa *et al.*, 2008).

The number of roots was also higher *ex vitro* in both methods of dilution. The IBA concentrations did not differ from each other, but they were higher than the control. The number of 'Xavante' blackberry roots also increased with IBA, up to 1.6 mM during the *ex vitro* rooting (Pelizza *et al.*, 2013). Besides the number of roots, their length was also higher *ex vitro*. The absence of the growth regulator promoted the same root length as the other treatments *ex vitro* diluted with ethanol (Tab. 3). When the dilution was



**Table 4.** Rooting, length of the highest root, number of leaves per plant, mortality, percentage of callus formation, number of roots per microcutting, growth and number of leaves per *Rubus erythroclados* plant treated with different concentrations of IBA diluted in NaOH (0.1 N) and placed *in* and *ex vitro*.

	IBA (mM)				
	0	2.46	4.92	7.38	
	Rooting (%)				
<i>In vitro</i>	6.2 bC	10.4 bBC	22.9 bAB	39.6 bA	
<i>Ex vitro</i>	89.6 aA	97.9 aA	87.5 aA	89.6 aA	
CV (%)	14.7				
	Largest root length (cm)				
<i>In vitro</i>	0.8 bA	0.4 bA	0.7 bA	0.8 bA	
<i>Ex vitro</i>	3.1 aA	3.8 aA	4.3 aA	3.2 aA	
CV (%)	24.8				
	Mortality (%)				Average
<i>In vitro</i>	60.4	87.5	75.0	54.2	69.3 a
<i>Ex vitro</i>	6.2	2.1	8.3	4.2	5.2 b
Average	4.8 A	5.3 A	5.5 A	4.5 A	
CV (%)	28.3				
	Callus formation (%) <sup>ns</sup>				
<i>In vitro</i>	0.0	0.0	4.2	2.1	
<i>Ex vitro</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	
CV (%)	66.2				
	Roots per microcutting				Average
<i>In vitro</i>	2.0	4.2	6.2	6.9	4.8 b
<i>Ex vitro</i>	5.3	8.4	6.3	8.7	7.2 a
Average	3.6 B	6.3 AB	6.2 AB	7.8 A	
CV (%)	18.1				
	Plant growth (cm)				
<i>In vitro</i>	0.3 aAB	0.0 bB	0.2 aAB	0.4 aA	
<i>Ex vitro</i>	0.7 aA	0.9 aA	0.4 aA	0.8 aA	
CV (%)	12.9				
	Leaves per plant				
<i>In vitro</i>	2.8 aA	0.0 bB	1.6 aA	2.0 aA	
<i>Ex vitro</i>	2.8 aAB	3.4 aA	1.3 aB	2.0 aAB	
CV (%)	20.0				

Means followed by the same lower case letter in the column and capital letter in the row do not differ statistically according to the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ). ns: not significant.

in NaOH, the growth regulator did not influence the root growth length (Tab. 4). Leitzke *et al.* (2009) observed that, when increasing the IBA concentration, there was a reduction in the root length of blackberries and raspberries.

In general, the *ex vitro* rooting formed higher plants with more new leaves, but the highest IBA concentrations (4.92 and 7.38 mM) were detrimental to the growth when IBA was diluted in ethanol (Tab. 3).

The high rates of rooting *ex vitro* in the absence of growth regulators show that this technique is

promising for the species in question and that *in vitro* rooting is not suitable. Thus, the *in vitro* multiplication and *ex vitro* rooting and acclimatization of the greenberry are recommended.

## CONCLUSIONS

An efficient and simple protocol can be used for *R. erythroclados* micropropagation with 5  $\mu$ M BA for *in vitro* shoot proliferation and *ex vitro* rooting of microcuttings using intermittent misting without the addition of a growth regulator.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for financial support via research scholarships that were granted to the first and second authors, respectively.

**Conflict of interests:** the manuscript was prepared and reviewed with the participation of the authors, who declare that there exists no conflict of interest that puts the validity of the presented results at risk.

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Augusto, C.S.S., L.A. Biasi, and C.A. Telles. 2006. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. *Rev. Bras. Frutic.* 28(3), 473-476. Doi: 10.1590/S0100-29452006000300029
- Campagnolo, M.A. and R. Pio. 2012. Enraizamento de estacas caulinares e radiculares de cultivares de amoreira-preta coletadas em diferentes épocas, armazenadas a frio e tratadas com IBA. *Ciênc. Rural* 42, 232-237. Doi: 10.1590/S0103-84782012000200008
- Clapa, D., A. Fira and N. Joshee. 2013. An efficient ex vitro rooting and acclimatization method for horticultural plants using float hydroculture. *HortScience* 48(9), 1159-1167.
- Cordeiro, J., C.V. Roderjan, and W.A. Rodrigues. 2011. Plantas lenhosas da floresta ombrófila mista do parque municipal das Araucárias – Guarapuava (PR). *Ambiência* 7, 441-460. Doi: 10.5777/ambiencia.2011.03.03
- Debnath, S.C. 2003. Micropropagation of small fruits. pp. 465-506. In: Jain, S.M. and K. Ishii (eds.). *Micropropagation of woody trees and fruits*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Doi: 10.1007/978-94-010-0125-0\_15
- Debnath, S.C. 2004. Clonal propagation of dwarf raspberry (*Rubus pubescens* Raf.) through in vitro axillary shoot proliferation. *Plant Growth Reg.* 43, 179-186. Doi: 10.1023/B:GROW.0000040110.53216.6a
- Del Castillo, A.R. and A.A. Zerda. 1990. Estudios preliminares para la propagación clonal in vitro de mora (*Rubus glaucus* L.). *Agron. Colomb.* 7(1-2), 17-25.
- Deng, R. and D.J. Donnelly. 1993. In vitro hardening of red raspberry through CO<sub>2</sub> enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. *Can. J. Plant Sci.* 73(4), 1105-1113. Doi: 10.4141/cjps93-149
- Erig, A.C., A. De Rossi, and G.R.L. Fortes. 2002. 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação in vitro da amoreira-preta (*Rubus idaeus*), cv. Tupy. *Ciênc. Rural* 32(5), 765-770. Doi: 10.1590/S0103-84782002000500005
- Jin, W., Y. Gu, and S.Z. Zhen. 1992. In vitro propagation of *Rubus* species. *Sci. Hortic.* 49(3-4), 335-340. Doi: 10.1016/0304-4238(92)90169-D
- Lazic, T. and D. Ruzic. 2007. Organogenesis in vitro from the leaf of blackberry cv. Cacanska Bestrna. *Genetika* 39, 69-78. Doi: 10.2298/GENSR0701069L
- Leitzke, L.N., C.R. Damiani, and M.W. Schuch. 2009. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento in vitro de amoreira-preta e framboeseira. *Rev. Bras. Frutic.* 31(2), 582-587. Doi: 10.1590/S0100-294520090002000037
- Leitzke, L.N., C.R. Damiani, and M.W. Schuch. 2010. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação in vitro de amoreira-preta e framboeseira. *Ciênc. Agrotec.* 34(2), 352-360. Doi: 10.1590/S1413-70542010000200012
- Maia, A.J. and R.V. Botelho. 2008. Reguladores vegetais no enraizamento de estacas lenhosas da amoreira-preta cv. Xavante. *Semina: Ciênc. Agrár.* 29, 323-330. Doi: 10.5433/1679-0359.2008v29n2p323
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473-479. Doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Oliveira, A.F., N.N.J. Chalfun, A.A. Alvarenga, J. Vieira Neto, R. Pio, and D.L. Oliveira. 2009. Estaquia de oliveira em diferentes épocas, substratos e doses de AIB diluído em NaOH e álcool. *Ciênc. Agrotec.* 33(1), 79-85. Doi: 10.1590/S1413-70542009000100011
- Oliveira, R.P. and A.F.P. Nino. 2009. Potencial de multiplicação in vitro de cultivares de framboeseira. *Rev. Bras. Frutic.* 31(1), 280-284. Doi: 10.1590/S0100-29452009000100040
- Oliveira, R.P., A.F.P. Nino, and L.V. Ferreira. 2008. Potencial de multiplicação in vitro de cultivares de amoreira-preta. *Rev. Bras. Frutic.* 30(3), 585-589. Doi: 10.1590/S0100-29452008000300004
- Pasa, M.S., G.L. Carvalho, M.W. Schuch, J.D. Schmitz, M.M. Torchelsen, G.K. Nickel, L.R. Sommer, T.S. Lima, and S.S. Camargo. 2012. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento in vitro da amoreira-preta 'Xavante'. *Ciênc. Rural* 42(8), 1392-1396. Doi: 10.1590/S0103-84782012000800010
- Pelizza, T.R., J. Muniz, P. Camargo, A.A. Kretschmar, and L. Rufato. 2013. Enraizamento ex vitro e aclimatização de plântulas micropropagadas de amoreira-preta 'Xavante'. *Rev. Bras. Frutic.* 35(1), 329-332. Doi: 10.1590/S0100-29452013000100039
- Poothong, S. and B.M. Reed. 2015. Increased CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> improve the growth of micropropagated red raspberries. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 51, 648-658. Doi: 10.1007/s11627-015-9720-y

- Sigarroa-Rieche, A.K. and C.L. García-Delgado. 2011. Establecimiento y multiplicación in vitro de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) variedad sin espinas, mediante ápices meristemáticos. *Acta Agron.* 60(4), 347-354.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2013. *Fisiologia vegetal*. 5<sup>th</sup> ed. Artmed, Porto Alegre, Brazil.
- Villa, F., M. Pasqual, F.A. Assis, L.A.S. Pio, and G.A. Assis. 2008. Crescimento in vitro de amoreira-preta: efeito de reguladores de crescimento e da cultivar. *Ciênc. Agrotec.* 32(6), 1754-1759. Doi: 10.1590/S1413-70542008000600012
- Welander, M. 1985. In vitro culture of raspberry (*Rubus idaeus*) for mass propagation. *J. Hortic. Sci.* 60(4), 493-499. Doi: 10.1080/14620316.1985.11515656
- Wu, J., S.A. Miller, H.K. Hall, and P.A. Mooney. 2009. Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of *Rubus*. *Plant Cell Tiss. Org.* 99, 17-25. Doi: 10.1007/s11240-009-9571-5

# Productive and qualitative performance of tomato plants as a function of the application of plant growth regulators and mineral nutrients

Desempeño productivo y cualitativo de plantas de tomate en relación con la aplicación de reguladores de crecimiento y nutrientes minerales

MARÍLIA CAIXETA SOUSA<sup>1,2</sup>  
LUAN FERNANDO ORMOND SOBREIRA RODRIGUES<sup>1</sup>  
MÔNICA BARTIRA DA SILVA<sup>1</sup>  
JANAINA OLIVEIRA CRUZ<sup>1</sup>  
MARLA SILVIA DIAMANTE<sup>1</sup>  
BRUNO NOVAES MENEZES MARTINS<sup>1</sup>  
LILIAN MASSARO SIMONETTI<sup>1</sup>  
JOÃO DOMINGOS RODRIGUES<sup>1</sup>



Tomato plantation in São Manuel-SP (Brazil).

Photo: M.C. Sousa

## ABSTRACT

The tomato fruit is rich in antioxidant compounds and has great nutritional and economic importance, annually promoting research on the nutritional and productive characteristics. The present study aimed to evaluate whether foliar application of commercial products based on growth regulators [auxin, cytokinin and gibberellin (Ax+CK+GA)], micronutrients [cobalt and molybdenum (Mi)] and mixtures of macro and micronutrients [nitrogen, boron, copper, molybdenum and zinc (Ma+Mi)], isolated and in combination, increase productivity and improve the post-harvest quality of tomato fruits (Predador F1). The experiment design used randomized blocks, with seven treatments and four repetitions, which were (T1) control; (T2) Ax+CK+GA; (T3) Ma+Mi; (T4) Mi; (T5) Ax+CK+GA + (Ma+Mi); (T6) Ax+CK+GA + Mi; and (T7) Ax+CK+GA + Mi + (Ma+Mi). The variables production, precocity, soluble solids content (SS), titratable acidity (TA), ratio (SS/TA), pH, total soluble sugars, ascorbic acid and weight loss were evaluated. The Ax+CK+GA application, isolated or in combination with Ma+Mi, promoted the precocity, and the use of isolated Ax+CK+GA and Mi improved the tomato plant productivity. The growth regulators, macro and micronutrients, isolated or in combination, increased the ascorbic acid content in the fruits.

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu-SP (Brazil). ORCID Sousa, M.C.: 0000-0003-1386-1670; ORCID Rodrigues, L.F.O.S.: 0000-0003-4766-953X; ORCID Silva, M.B.d.: 0000-0002-7730-2213; ORCID Cruz, J.O.: 0000-0003-1448-3894; ORCID Diamante, M.S.: 0000-0002-2243-8631; ORCID Martins, B.N.M.: 0000-0002-2664-6817; ORCID Simonetti, L.M.: 0000-0002-8091-3138; ORCID Rodrigues, J.D.: 0000-0003-4947-0997

<sup>2</sup> Corresponding author. [mariliacsbio@yahoo.com.br](mailto:mariliacsbio@yahoo.com.br)

**Additional key words:** *Solanum lycopersicum* L., production, post-harvest, mineral nutrition, plant hormones.

## Resumen

El tomate es un fruto rico en compuestos antioxidantes y tiene gran importancia nutricional y económica; anualmente se promueve investigaciones relacionadas con las características nutricionales y productivas. El objetivo de este estudio fue evaluar si la aplicación foliar de productos comerciales a base de reguladores vegetales [auxina, citocinina y giberelina (Ax+CK+GA)], micronutrientes [cobalto y molibdeno (Mi)] y mezcla de macro y micronutrientes [nitrógeno, boro, cobre, molibdeno y zinc (Ma+Mi)], de forma individual y combinada, sobre el aumento de la productividad y mejora de la calidad poscosecha de los frutos de tomate (Predador F1). El diseño experimental consistió en bloques al azar, con siete tratamientos y cuatro repeticiones, siendo (T1) control; (T2) Ax+CK+GA; (T3) Ma+Mi; (T4) Mi; (T5) Ax+CK+GA + (Ma+Mi); (T6) Ax+CK+GA + Mi; (T7) Ax+CK+GA + Mi + (Ma+Mi). Se evaluaron las variables producción, precocidad, contenido de sólidos solubles (SS), acidez titulable (AT), relación SS/AT, pH, azúcares solubles totales, ácido ascórbico y pérdida de peso. La aplicación de Ax+CK+GA de forma individual o combinada con Ma+Mi promovió la precocidad, mientras el uso de Ax+CK+GA y Mi, de forma separada, mejoró la productividad del tomate. Los reguladores de crecimiento y los macro y micronutrientes, separados o combinados, proporcionaron un aumento en el contenido de ácido ascórbico en los frutos.

**Palabras clave adicionales:** *Solanum lycopersicum* L., producción, poscosecha, nutrición mineral, hormonas vegetales.

Received for publication: 03-12-2017 Accepted for publication: 30-05-2018

## INTRODUCTION

The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is the second most produced horticultural crop in the world. In Brazil, in 2016, production was 3.74 million tons, with an area of 58,600 ha and an output of 64,000 kg ha<sup>-1</sup>, and the states Goiás, São Paulo and Minas Gerais were responsible for 63.7% of the production (IBGE, 2016).

In order to meet the demand of the consumer market, crop management that improves the productive and qualitative aspects of crops are needed, emphasizing the application of products, such as biostimulants, which are defined as any substance applied to plants in order to increase nutritional efficiency, tolerance to abiotic stress and/or quality characteristics, regardless of nutrient contents, including products formulated with a mixture of growth regulators (Du Jardin, 2015).

Plant growth regulators are chemical substances, not nutrients, synthetic or natural, that act like plant hormones; with an ideal balance, they can induce

a positive effect on plant development (Castro and Vieira, 2001; Fagan *et al.*, 2015). Nutrients play key roles since they are involved in the regulation of many essential processes, such as enzymatic activation, photosynthesis, starch formation and proteins synthesis (Fagan *et al.*, 2016).

The foliar application of plant growth regulators, together with foliar fertilizers, is a very common practice in many countries, used to improve crop development, productivity and quality. In Brazil, its use has shown great potential, with studies that have proven efficiency in cultivations such as soy, corn, beans and cotton (Bertolin *et al.*, 2010; Dourado Neto *et al.*, 2012; Bontempo *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016). This technique has been used for horticultural crops, but needs research verifies efficiency.

Thus, this study aimed to evaluate whether a foliar application of commercial products based on plant growth regulators (auxin, cytokinin and gibberellin), micronutrients (cobalt and molybdenum) and



the mixture of macro and micronutrients (nitrogen, boron, copper, molybdenum and zinc), isolated or in combination, increases productivity and improves tomato 'Predador F1' fruit quality.

## MATERIAL AND METHODS

This study was conducted in the experimental area belonging to the College of Agricultural Sciences, São Paulo State University, located in the city of São Manuel-SP, Brazil (22°46'33.72" S and 48°34'7.29" W and 768 m altitude). According to the Köppen climatic classification, the climate is a Cfa type (Temperate Rainy Climate) (Cunha and Martins, 2009).

We used an arc-shaped protected environment, 24×7 m and 3 m tall, covered with a low-density 150 μm polyethylene film, closed on the sides with 75% screen shading.

The soil was classified as dystrophic red latosol (Embrapa, 2013). In the layer between 0 and 0.20 m, the soil exhibited the following chemical characteristics: 11 g dm<sup>-3</sup> of organic sample; pH 6.2; 99 mg dm<sup>-3</sup> of P (resin); 3.8 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> of K; 50 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> of Ca; 11 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> of Mg; 0.53 mg dm<sup>-3</sup> of B; 1.7 mg dm<sup>-3</sup> of Co; 11.4 mg dm<sup>-3</sup> of Mn; 7.1 mg dm<sup>-3</sup> of Zn; CTC = 75 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> and V% 86. The fertilization was performed based on the chemical analysis of the soil, according to Alvarenga (2004). The fertilization at planting was performed in the furrow and the top dressing was done via fertirrigation.

The experiment design used randomized blocks with seven treatments and four repetitions. Six plants, four of them being useful, were used in each repetition. The treatments were (T1) control; (T2) 0.5 L ha<sup>-1</sup> plant growth regulators (Ax+CK+GA); (T3) 3 L ha<sup>-1</sup> macro and micronutrients (Ma+Mi); (T4) 1 L ha<sup>-1</sup> micronutrients (Mi); (T5) 0.5 L ha<sup>-1</sup> Ax+CK+GA + 3 L ha<sup>-1</sup> Ma+Mi; (T6) 0.5 L ha<sup>-1</sup> Ax+CK+GA + 1 L ha<sup>-1</sup> Mi; and (T7) 0.5 L ha<sup>-1</sup> Ax+CK+GA + 3 L ha<sup>-1</sup> Ma+Mi + 1 L ha<sup>-1</sup> Mi.

The experiment was conducted from March to August of 2014. The first application of the treatments was done 20 days after transplanting (dat), when the plants had emitted the first raceme, and the others were done every 20 d, for a total of five applications. The foliar applications were made using a CO<sub>2</sub>-pressurized backpack sprayer with a constant pressure of 2.5 kgf cm<sup>-2</sup>. In all of the treatments, we added

vegetable oil (Natur'l oil®) at 0.5%, and the solution was acidified, maintaining the final pH of the mixture between 4.0 and 5.0 using P-51® (1% nitrogen and 51% phosphoric acid) (Stoller do Brasil, São Paulo-SP, Brazil).

Stimulate® was used as a source of plant growth regulators. This commercial product contains 0.005% indole-3-butyric acid [auxin (Ax)], 0.009% kinetin [cytokinin (CK)] and 0.005% gibberellic acid [gibberellin (GA)]. For the mixture of macro and micronutrients, we used the commercial product Mover®, containing 5% nitrogen (N), 4.5% zinc (Zn), 4% boron (B), 0.17% copper (Cu) and 0.015% molybdenum (Mo), and, for the mixture of micronutrients, the commercial product Hold®, containing 3% molybdenum (Mo) and 2% cobalt (Co), was used. All products came from Stoller do Brasil (São Paulo-SP, Brazil). 'Predador F1' hybrid tomato plant seedlings, of the undetermined type, were transplanted 25 d after the sowing, with a spacing of 1.0×0.5 m, resulting in a density of 20,000 plants/ha. The plants were conducted with a stem during the cycle, using one plant per hole, and the tomato plants were tutored vertically until the fifth fruit bunch, when apical pruning was performed (60 and 70 dat). Diseases and plagues were controlled according to the conventional recommendations.

Weekly, the fruits were harvested when presenting a red base. Afterwards, they were evaluated according to the production, precocity, soluble solids content (SS), titratable acidity (TA), ratio (SS/TA), pH, total soluble sugars, ascorbic acid and weight loss.

For the production evaluation, the fruits were weighed after being selected as "non-commercial" or "commercial" according to the methodology proposed by CQH/Ceagesp (2003).

The harvests were performed eight times, calculating the relative proportion of each harvest in the total fruit productivity, aiming to determine the harvest precocity. The treatments that, with four harvests, produced values close to 50% of total productivity, according to the method adapted from Martins *et al.* (2017) were considered more precocious.

Post-harvest chemical analyses were performed at 110 dat. The fruit pulp was homogenized in a domestic grinder (mixer) and evaluated according to the titratable acidity, expressed in grams of citric acid per 100 g of pulp, obtained with titration of 5 g of diluted

pulp per 100 mL of distilled water (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

The total soluble solids was determined with a digital refractometer (Atago, Tokyo, Japan). The results were expressed in °Brix, and the ratio between the SS content and TA (SS/TA) was calculated (AOAC, 2005). The pH was determined using a potentiometer on a solution of homogenized pulp (Analyser – model pH 300) (Ministério da Saúde, 2005). The ascorbic acid content (AA) was determined using 10 g of tomato pulp mixed with 0.5% oxalic acid. This solution was titrated with a 0.1 mol L<sup>-1</sup> 2,6-dichloro-phenol-indophenol solution. The results were expressed in mg of ascorbic acid 100 g<sup>-1</sup> of pulp (MAPA, 2006).

The total soluble sugars (TSS) was determined with the method described by Somogy, adapted by Nelson (1944), and the results were expressed as a percentage.

In the analysis of weight loss, tomato samples (10 fruits) were selected from each repetition, placed on five expanded polystyrene commercial foam trays and weighed every two days while the fruits presented a weight loss lower than 10%. These fruits were kept on the laboratory bench at room temperature, between 17.2 and 22.4°C, with a relative humidity between 10 and 70%. The difference between the initial and final fruit weights in each time interval was calculated as a percentage (Chitarra and Chitarra, 2005).

The results were submitted to variance analysis (test F) and the means were compared with the Tukey test, at 5% probability, using the SAS 9.2 statistical package (SAS, 2002).

## RESULTS AND DISCUSSION

The plants that received an application of micronutrient (Mi) and the mixture of plant growth regulators + micronutrients [Ax+CK+GA + (Mi)] presented the highest average of total fruit number and total productivity, differing from the control treatment (Tab. 1). According to Matos *et al.* (2017), the application of plant growth regulators and micronutrients allows plants to express their greatest genetic productive potential because they are important metabolic activators.

For the average total fruit weight, the treatment with Ax+CK+GA and the control presented higher values in relation to the treatment with an application of

Mi and [Ax+CK+GA + (Mi)]. Amaro (2014), working with the application of the same products on vines, observed that the use of the Ax+CK+GA product induced a higher total weight of tomato bunches per plant, besides increasing the values of length and height. In addition, the application of these plant growth regulators and the product based on Mi, isolated or combination, increased the average weight of bunches in relation to the control. The author attributed this effect to the influence of the products used on the efficiency of gas exchanges.

Souza (2014), working with the same products on vines, observed that the combination of the mixtures of growth regulators and of mineral nutrients promoted alterations in plant metabolism, increasing production.

In this experiment, the application of Mi and [(Ax+CK+GA + (Mi))] had positive results as a result of the mechanism of action of these compounds that improved growth and plant development. This occurs because growth regulators, such as auxin, gibberellin and cytokinins, when applied in synthetic forms, can induce a hormonal balance.

The application of some micronutrients, used with physiological appeal, can also promote similar results. In the Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza*), for example, the effect of the application of Upper® (Ax+Ck+GA+Mo) was evaluated on the pre-rooting of seedlings, where the authors observed a significant increase in the number and length of the roots, indicating that the product can act as a rooting stimulator (Reghin *et al.*, 2000).

This factor becomes more evident when observing the functions of molybdenum, a cofactor of aldehyde oxidase, which is involved in auxin biosynthesis, catalyzing the oxidation of indole-3-acetaldehyde to indole-3-acetic acid during initial plant development (Broadley *et al.*, 2012). Thus, micronutrient applications can increase auxin levels in plants, which are responsible for regulating different stages of development, such as cell expansion and division, as well as vascular tissue differentiation (Di *et al.*, 2016). Molybdenum is also a cofactor of nitrate reductase in the metabolic pathway of nitrogen assimilation (Broadley *et al.*, 2012).

Cobalt, another micronutrient present in the Mi treatment, plays a role in the development of lateral roots (Xu *et al.*, 2011), where the treatment with

CoCl<sub>2</sub> induced the regulation of genes involved in the formation of lateral roots in tomato plants. These structures perform a considerable function in the increase of the water absorption capacity and mineral nutrients, anchorage of plants in soil and cytokinin synthesis.

This affirmation can explain the data presented in table 1, where the application of micronutrients, isolated (Mi) or in mixture [Ax+CK+GA + (Mi)], increased the production of a higher number of fruit, as compared to the control treatment. For the total commercial production, the application of Ax+CK+GA and Mi also provided an increase in productivity.

In the average total weight characteristic of commercial fruit (Tab. 1), the application of (Mi), isolated or in mixture [Ax+CK+GA + (Mi)], provided a lower value, as compared to the control treatment. Higher averages were observed in the control and with the application of (Ax+CK+GA); however, it is worth pointing out that they did not differ significantly from the treatments (Ma+Mi), [Ax+CK+GA + (Ma+Mi)] and [Ax+CK+GA + (Mi) + (Ma+Mi)].

Tavares *et al.* (2014) observed that the application of Stimulate® in tomato decreased the number of fruits with a diameter lower than 40 mm (considered non-commercial), improving the quality of the produced fruits.

It was also possible to notice that the treatments with the application of Mi and [Ax+CK+GA +

(Mi)] produced a higher number of fruits with a less than average weight as a result of the application of molybdenum, which might have contributed to flower fixation and, consequently, increasing the number of produced fruits.

The increased fruit production can also be explained by the fact that the Ax+CK+GA mixture had gibberellins. This growth regulator regulates almost all plant processes, including fruit fixation and development (Wang *et al.*, 2009). Gibberellins are considered the second group of phytohormones that present essential function in the coordination of fruit and seeds growth. Type GA<sub>1</sub> and GA<sub>3</sub> active gibberellins are capable of inducing fruit setting and effective fructification in many plant species, such as the tomato (Dorcey *et al.*, 2009).

Cato *et al.* (2013), studying the effect of combined and isolated applications of plant growth regulators on the development of tomato plants cv. Micro-Tom, concluded that the combined application of gibberellic acid, indolbutyric acid and kinetin or of the commercial product Stimulate® induced an increase in the accumulation of dry matter in roots and in the fresh and dry matter of fruits, as compared to the control. Ramos (2013) verified that the application of Stimulate® on tomato plants presented efficiency in the gas exchanges and in the maintenance of leaf coloration, which can translate to higher fruit production.

Figure 1 shows the average percentage of the obtained fruits in each harvest and treatment. In this figure,

**Table 1. Average total fruit (ATF) number per area, total productivity (TP), average total fruit weight (AWTF), number of commercial fruits (NCF), commercial production (CP) and average weight of commercial fruits (AWCF) of the tomato plants treated with plant growth regulators and nutrients. São Manuel-SP, Brazil, 2014.**

Treatment	ATF	TP	AWTF	NCF	CP	AWCF
	(m <sup>-2</sup> )	(kg m <sup>-2</sup> )	(g/fruit)	(m <sup>-2</sup> )	(kg m <sup>-2</sup> )	(g/fruit)
Control	18 b	3,70 b	199,76 a	17 c	3,58 b	211,53 a
Ax+CK+GA	26 ab	5,37 a	204,47 a	24 abc	4,95 a	207,30 a
(Ma+Mi)	24 ab	4,3 ab	183,07 ab	21 abc	4,09 ab	194,06 ab
Mi	32 a	4,99 a	157,09 b	30 a	4,82 a	162,03 b
Ax+CK+GA + (Ma+Mi)	24 ab	4,47 ab	188,32 ab	23 abc	4,28 ab	192,91 ab
Ax+CK+GA + (Mi)	30 a	4,61 ab	159,88 b	25 ab	4,26 ab	171,23 b
Ax+CK+GA + (Mi) + (Ma+Mi)	26 ab	4,61 ab	178,37 ab	23 abc	4,29 ab	188,39 ab
CV(%)	15,58	11,2	9,21	14,26	11,97	7,33

Means followed by the same letter in the columns do not differ significantly from each other according to the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ). Ax+CK+GA: plant growth regulators; Ma+Mi: mixture of macro and micronutrients; Mi: mixture of micronutrients.

it is possible to determine the proportion of fruit in relation to the total produced for each treatment; in other words, it serves as a tool to determine whether there was precocity.

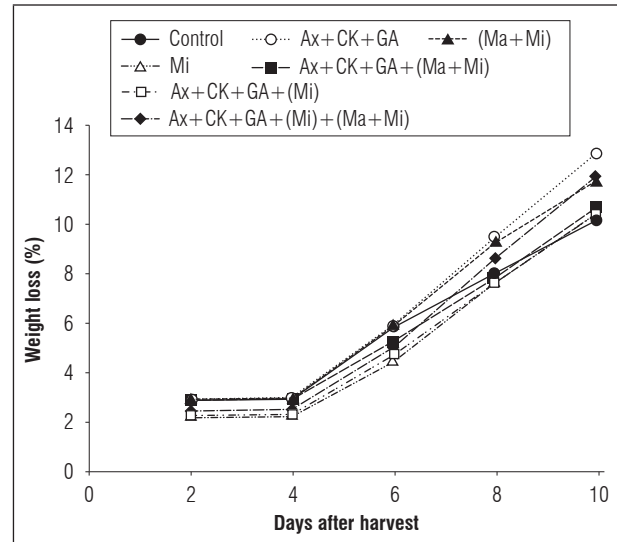
The cultivation provided eight harvests, and the first and eighth were the less productive ones. For precocity, two treatments stood out: Ax+CK+GA and [Ax+CK+GA + (Ma+Mi)]. The plants treated with Ax+CK+GA showed 47.45% of the total, and treatment [Ax+CK+GA + (Ma+Mi)] had 51.67%. This represents, in kg m<sup>-2</sup>, that, with four harvests, Ax+CK+GA produced 254.82, [Ax+CK+GA + (Ma+Mi)] produced 230.98, and the control group produced 41.08% of the total, with 152.02 kg m<sup>-2</sup> (Fig. 1).

Even though the application of Mi was the second most productive (total production: 4.99 kg m<sup>-2</sup>), it did not promote precocity. With four harvests, 38.78% of the total fruit weight was obtained. Between harvest three and seven, this treatment had a good distribution of weight of the harvested fruits, between 15.22 and 21.94%, which is an important factor for production uniformity, making it useful as a for weekly harvest prediction. However, it was not effective for precocity, but, if these results were reached from the second harvest, the Mi treatment would possibly reach precocity results similarly to Ax+CK+GA and [Ax+CK+GA + (Ma+Mi)].

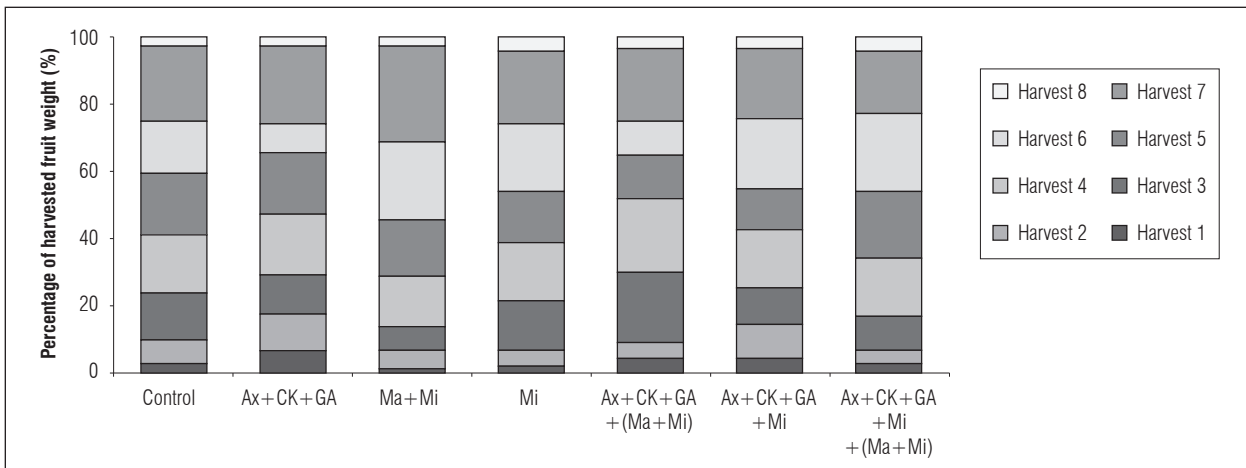
For the post-harvest quality characteristics, there was no difference between the treatments for weight loss (Fig. 2). The literature reports that weight loss between 3 and 6% can cause a decline in fruit quality,

a value that is normally reached in around six days. It is important to emphasize that fruits with up to 10% weight loss are not commercialized (Chitarra and Chitarra, 2005).

We observed differences between the treatments during the chemical analyses in the pH and ascorbic acid evaluations. However, there were no differences in the percentage of total soluble sugars, soluble solids, titratable acidity or ratio (Tab. 2).



**Figure 2. Weight loss for 10 d in tomato plant fruits treated with plant growth regulators and nutrients. São Manuel-SP, Brazil, 2014. Ax+CK+GA: plant growth regulators; Ma+Mi: mixture of macro and micronutrients; Mi: mixture of micronutrientes.**



**Figure 1. Percentage of harvested fruit weight depending on the harvest, of tomato plants treated with plant growth regulators and mineral nutrients. São Manuel-SP, Brazil, 2014. Ax+CK+GA: plant growth regulators; Ma+Mi: mixture of macro and micronutrients; Mi: mixture of micronutrientes.**

**Table 2. Soluble solids content (SS), titratable acidity (TA), ratio (SS/TA), pH, total soluble sugars (TSS), and ascorbic acid (AA) in tomato plant fruits treated with plant growth regulators and nutrients. São Manuel-SP, Brazil. 2014.**

Treatment	SS	TA	SS/TA	pH	TSS	AA
	(°Brix)	(% citric acid)	(ratio)		(%)	(mg 100 g <sup>-1</sup> )
Control	3,5	0,27	13,1	4,37 a	1,9	7,8 b
Ax+CK+GA	3,6	0,29	12,3	4,33 ab	2,0	13,5 a
(Ma + Mi)	3,4	0,28	12,2	4,29 b	1,9	13,1 a
Mi	3,5	0,29	12,2	4,31 ab	2,0	13,7 a
Ax+CK+GA + (Ma+Mi)	3,6	0,27	13,1	4,34 ab	1,8	13,1 a
Ax+CK+GA + (Mi)	3,6	0,28	12,7	4,29 b	1,9	15,1 a
Ax+CK+GA + (Mi) + (Ma+Mi)	3,6	0,28	13,2	4,31 ab	1,8	14,6 a
CV (%)	5,86	7,53	9,26	0,66	9,72	9,58

Means followed by the same letter in the columns do not differ significantly from each other according to the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ). Ax+CK+GA: plant growth regulators; Ma+Mi: mixture of macro and micronutrients; Mi: mixture of micronutrients.

The average pH values of the fruit varied from 4.30 to 4.37. For all of the treatments, the averages remained within the variation range considered ideal for quality tomatoes, where the desirable pH interval is 3.7 to 4.5 (Giordano *et al.*, 2000). We observed a higher value in the control treatment and a lower one in the plants that were treated with (Ma+Mi) and [Ax+CK+GA + (Mi)]. However, there were only significant differences between these and the other treatments.

The ascorbic acid content (AA) was higher for all treatments, as compared to the control. Thus, we inferred that the increase of the AA content was related to the action of the mineral products and growth regulators used in this study in the metabolism, demonstrating that their application increases some antioxidant compounds in fruits.

Good quality tomato fruits should have a ratio lower than 10. In this study, this ratio varied between 12.20 and 13.21, indicating it is a great product for processing, as well as for *in natura* consumption.

## CONCLUSION

The application of commercial products based on plant growth regulators, isolated or in combination with mixtures of macro and micronutrients, promoted the precocity of the harvest. The use of growth regulators and isolated micronutrients improved the tomato plant productivity. The plant growth regulators, macro and micronutrients, isolated or in combination, increased the ascorbic acid content in the tomato fruits.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for scholarship (166489/2013-1), Stoller do Brasil and Agristar for support in the development of this study.

**Conflict of interests:** the manuscript was prepared and reviewed with the participation of the authors, who declare that there exists no conflict of interest that puts the validity of the presented results at risk.

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Alvarenga, M.A.R. 2004. Tomate: produção em campo, casa-de-vegetação e em hidroponia. 2<sup>nd</sup> ed. Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Brazil.
- Amaro, A.C.E. 2014. Respostas fisiológicas à aplicação de reguladores vegetais e nutrientes em videira 'Crimson Seedless'. Ph.D. thesis. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu-SP, Brazil.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). 2005. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry International. 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, MD, USA.
- Bertolin, D.C., M.E. Sá, O. Arf, E.J. Furlani, S. Colombo, and F.L.B.M. Carvalho. 2010. Increase of the productivity of the soybean crop with the application of biostimulants. *Bragantia* 69(2), 339-347. Doi: 10.1590/S0006-87052010000200011
- Bontempo, A.F., F.M. Alves, G. Daier, O. Pessoa, L.G. Machado, L. Otávio, D. Silva, and A. Aquino. 2016. Effect of biostimulants and nutrients on seed germination and growth of beans, corn and soybean. *Rev. Bras.*



- Milho Sorgo 15(1), 86-93. Doi: 10.18512/1980-6477/rbms.v15n1p86-93
- Broadley, M., P. Brown, I. Cakmak, J.F. Ma, Z. Rengel, and F. Zhao. 2012. Beneficial elements. pp. 249-269. In: Marschner, P. (ed.). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3<sup>th</sup> ed. Academic Press, San Diego, CA, USA. Doi: 10.1016/B978-0-12-384905-2.00008-X
- Castro, P.R.C. and E.L. Vieira, 2001. Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical. Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba-RS, Brazil.
- Cato, S.C., W.R. Macedo, L.E.P. Peres, and P.R.C. Castro. 2013. Sinergism among auxins, gibberellins and cytokinins in tomato cv. Micro-Tom. *Hortic. Bras.* 31(4), 549-553. Doi: 10.1590/S0102-05362013000400007
- Chitarra, M.I.F. and A.B. Chitarra. 2005. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. Escola Superior Agrícola de Lavras (ESAL), Fundação de Apoio ao Ensino Pesquisa e Extensão (FAEPE), Lavras-MG, Brazil.
- CQH (Centro de Qualidade em Horticultura) / Ceagesp (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo). 2003. Programa brasileiro para a melhoria dos padrões comerciais e de embalagens de tomate. São Paulo-SP, Brazil.
- Cunha, A.R. and D. Martins. 2009. Classificação climática para os municípios de Botucatu e São Manuel, SP. *Irriga* 14(1), 1-11. Doi: 10.15809/irriga.2009v14n1p01
- Di, D.W., C. Zhang, P. Luo, C.V.V. An, and G.Q. Guo. 2016. The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA? *Plant Growth Regul.* 78(3), 275-285. Doi: 10.1007/s10725-015-0103-5
- Dorcey, E., C. Urbez, M.A. Blazquez, J. Carbonell, and A. Perez-Amador. 2009. Fertilization-dependent auxin response in ovules triggers fruit development through modulation of gibberellin metabolism in *Arabidopsis*. *Plant J.* 58(2), 318-332. Doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03781.x
- Dourado Neto, D., G.J.A. Dario, T.N. Martin, M.R. Silva, P.S. Pavinato, and T.L. Habitzreiter. 2012. Adubação mineral com cobalto e molibdênio na cultura da soja. *Semin. Agrar.* 33(1), 2741-2752. Doi: 10.5433/1679-0359.2012v33Sup1p2741
- Du Jardin, P. 2015. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic.* 196, 3-14. Doi: 10.1016/j.scienta.2015.09.021
- Embrapa. 2013. Sistema brasileiro de classificação de solos. 3<sup>th</sup> ed. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Rio de Janeiro-RJ, Brazil.
- Fagan, E.B., E.O. Ono, J.D., Rodrigues, L.H. Soares, and D. Dourado Neto. 2016. Fisiologia vegetal: metabolismo e nutrição mineral. Andrei, Piracicaba-SP, Brazil.
- Fagan, E.B., E.O. Ono, J.D. Rodrigues, A. Chaulfun Junior, and D. Dourado Neto. 2015. Fisiologia vegetal: reguladores vegetais. Andrei, Piracicaba-SP, Brazil.
- Giordano, L.B. and C.S. da Ribeiro. 2000. Origem botânica e composição química do fruto. pp. 36-59. In: Silva, J.B.C. da and L.B. Giordano (eds.). *Tomate para o processamento industrial*. Embrapa Comunicação para transferência de Tecnologia, Brasília, Brazil.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2016. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil, dezembro 2016. *Levant. Sistem. Prod. Agríc.* 29(12), 1-82.
- Instituto Adolfo Lutz. 2008. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4<sup>th</sup> ed. São Paulo-SP, Brazil.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). 2006. Método de tillmans modificado. In: <http://www.agricultura.gov.br>; consulted: November, 2017.
- Martins, B.M.N., J.S. Candian, P.N. de Lima, C.V. Corrêa, A.M. de S. Gouveia, J.O. Silva, F.M. de S. Santana, and A.I.I. Cardoso. 2017. Effect of phosphorus (P) doses on tomato seedlings production in poor nutrients substrates and its importance on fruit yield. *Aust. J. Crop Sci.* 11(05), 567-572. Doi: 10.21475/ajcs.17.11.05
- Matos, J.P., E.C.S.S. Correia, R.N.F. Monteiro, F.J. Domingues Neto, and D.P. da Silva. 2017. Floração e rendimento de frutos da abobrinha italiana 'Daiane' sob aplicação de regulador vegetal e fertilizante foliar. *Braz. J. Biosyst. Eng.* 11(1), 107-115. Doi: 10.18011/bioeng2017v11n1p107-115
- Ministério da Saúde - Agência Nacional de vigilância Sanitária. 2005. Métodos físico-químicos para análise de alimentos/Ministério da Saúde. Brasília, Brazil.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glicose. *J. Biol. Chem.* 153, 159-161.
- Ramos, A.R.P. 2013. Produtos de efeitos fisiológicos no desenvolvimento de plantas de tomate 'Giuliana', na produção e pós-colheita de frutos. Ph.D. thesis. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu-SP, Brazil.
- Reghin, M.Y., R.F. Otto, and J.B.C. Silva. 2000. "Stimulate Mo" e proteção com "Tecido não Tecido" no pré-enraizamento de mudas de mandioquinha-salsa. *Hortic. Bras.* 18(1), 53-56. Doi: 10.1590/S0102-0536200000100012
- Silva, R.D.A., J.L. Santos, L.S. Oliveira, M.R.S. Soares, and S.M.S. Santos. 2016. Biostimulants on mineral nutrition and fiber quality of cotton crop. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.* 20(12), 1062-1066. Doi: 10.1590/1807-1929/agriambi.v20n12p1062-1066
- Souza, E.R. 2014. Fenologia e mistura de reguladores vegetais e de fertilizante foliar no metabolismo da videira cv. Sweet Sunshine em clima semiárido. Ph.D. thesis. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu-SP, Brazil.

- SAS Institute. 2002. User's guide. Statistical analysis system. Cary, NC, USA.
- Tavares, S., P.R.C. Castro, E.J. Ambrosano, S.C. Cato, and D.E. Foltran. 2014. Efeitos de bioestimulante no desenvolvimento de frutos de tomateiro 'Carmen'. *Cuad. Agroecol.* 9(4), 2236-7934.
- Wang, H., N. Schauer, B. Usadel, P. Frasse, M. Zouine, M. Hernould, A. Latché, J.C. Pech, A.R. Fernie, and M. Bouzayen. 2009. Regulatory features underlying pollination-dependent and independent tomato fruit set revealed by transcript and primary metabolite profiling. *Plant Cell.* 21, 1.428-1.452. Doi: 10.1105/tpc.108.060830
- Xu, S., B. Zhang, Z.Y. Cao, T.F. Ling, and W.B. Shen. 2011. Heme oxygenase is involved in cobalt chloride-induced lateral root development in tomato. *Biometals* 24(2), 181-91. Doi: 10.1007/s10534-010-9386-1

# Interaction between biological and chemistry fungicides and tomato pollinators

## Interacción entre fungicidas biológicos y químicos con polinizadores de tomate



CARLOS DE MELO E SILVA-NETO<sup>1, 7</sup>  
ANNA CLARA CHAVES RIBEIRO<sup>2</sup>  
FLAVIANA LIMA GOMES<sup>3</sup>  
JORDANA GUIMARÃES NEVES<sup>4</sup>  
ANIELA PILAR CAMPOS DE MELO<sup>5</sup>  
FRANCINE NEVES CALIL<sup>6</sup>  
ABADIA DOS REIS NASCIMENTO<sup>4</sup>  
EDIVANI VILLARON FRANCESCHINELLI<sup>3</sup>

*Paratrigona lineata* (left), *Exomalopsis analis* (center),  
*Augochloropsis* sp. (right). Tomatoes flower and leaf.

Photo: C.d.M.e Silva-Neto

### ABSTRACT

The use of agrochemicals is harmful to bees visiting agricultural crops, reducing production gains from pollination, but the effect of fungicides on these bees is not known. The objective of this study was to verify the effect of bee visitation influenced by different fungicides on the tomato crop and on the deposition of pollen grains on the stigma, number of seeds, mass and fruit size. The experiment was conducted with 10 treatments: (T1) control treatment, without application of agrochemicals; (T2 and T3) *Bacillus subtilis* in different application frequencies; (T4) copper hydroxide; (T5) *B. subtilis* and copper hydroxide; (T6) acibenzolar-S-methyl; (T7) (trifloxystrobin+tebuconazole) and *B. subtilis*; (T8) copper hydroxide+Mancozeb; (T9) propineb+(trifloxystrobin+tebuconazole); (T10) (trifloxystrobin+tebuconazole)+*B. subtilis*+copper hydroxide. The presence of the pollination mark on the flower, the pollen load of the stigmas, the number of seeds per fruit, and the size and mass of the fruits were determined in each treatment. Subsequently, the mortality rate of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae) exposed to four fungicides (trifloxystrobin+tebuconazole; manganese and zinc; copper hydroxide; *Bacillus subtilis*) was estimated. The mortality rate of *M. quadrifasciata* over 24 h

<sup>1</sup> Laboratório de Sementes e Coleções Biológicas, Instituto Federal de Goiás (IFG), Goiás-GO (Brazil). ORCID Silva-Neto, C.d.M.e.: 0000-0001-8624-3836

<sup>2</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO (Brazil). ORCID Ribeiro, A.C.C.: 0000-0002-0335-0407

<sup>3</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Biologia Reprodutiva de Plantas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO (Brazil). ORCID Gomes, J.G.: 0000-0003-2824-0180; ORCID Franceschinelli, E.V.: 0000-0001-9050-8577

<sup>4</sup> Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO (Brazil). ORCID Neves, J.G.: 0000-0001-8102-3236; ORCID Nascimento, A.d.R.: 0000-0003-3952-5878

<sup>5</sup> Campus Avançado Cristalina, Instituto Federal Goiano, Cristalina-GO (Brazil). ORCID Melo, A.P.C.d.: 0000-0002-5687-5928

<sup>6</sup> Escola de Agronomia, Setor de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO (Brazil). ORCID Calil, F.N.: 0000-0003-2882-9622

<sup>7</sup> Corresponding author. carloskoa@gmail.com



of evaluation was higher in the treatments with copper hydroxide and trifloxystrobin+tebuconazole (75 and 50%, respectively). The mortality rate was lower in the treatments with manganese and zinc and *Bacillus subtilis* and in the control treatment. The treatments with trifloxystrobin+tebuconazole reduced the presence of bite marks on the flowers and of pollen grains on the flower stigma. The fruits of the control treatments and treatments with *B. subtilis* and copper hydroxide were larger and had greater mass, as compared to other agrochemicals. Thus, a higher number of pesticide applications on the tomatoes reduced bee visitation rates to the flowers and, consequently, reduced the amount of pollen grains deposited on the stigmas, also reducing the fruit production.

**Additional key words:** bees, pollen load, *Bacillus subtilis*, trifloxystrobin, tebuconazole, compatibility of agrochemicals.

## RESUMEN

El uso inapropiado de agroquímicos es perjudicial para las abejas que visitan los cultivos agrícolas, lo que reduce la producción por la afectación de la polinización y son pocos los estudios sobre este tema. El objetivo de este estudio fue verificar la incidencia de diferentes fungicidas sobre la visita de abejas en cultivos de tomate y sus efectos sobre la deposición de granos de polen en el estigma, número de semillas, masa y tamaño del fruto. Los experimentos consistieron en 10 tratamientos que fueron: (T1) tratamiento control sin agroquímicos; (T2 y T3) *Bacillus subtilis* en diferentes frecuencias de aplicación; (T4) hidróxido de cobre; (T5) *B. subtilis* e hidróxido de cobre; (T6) acibenzo-lar-S-metilo; (T7) trifloxistrobina+tebuconazol y *B. subtilis*; (T8) hidróxido de cobre + Mancozeb; (T9) propineb+(-trifloxistrobina+tebuconazol); (T10) (trifloxistrobina+tebuconazol)+*B. subtilis*+hidróxido de cobre. Se determinó la presencia de la marca de polinización en la flor, la carga de polen en los estigmas, el número de semillas por fruto, y el tamaño y masa de los frutos en cada tratamiento. Posteriormente, se estimó la tasa de mortalidad de *Melipona quadrifasciata* expuesta a cuatro fungicidas (trifloxistrobina+tebuconazol, manganeso y zinc, hidróxido de cobre, *Bacillus subtilis*). La tasa de mortalidad de *M. quadrifasciata* en 24 horas de evaluación fue mayor en los tratamientos con hidróxido de cobre y trifloxistrobina+tebuconazol (75 y 50%, respectivamente). La tasa de mortalidad fue menor en los tratamientos con manganeso y zinc, *Bacillus subtilis* y el tratamiento de control. Los tratamientos con trifloxistrobina y tebuconazol redujeron la presencia de marcas de mordida y granos de polen en el estigma de las flores. Los frutos de los tratamientos control y con *B. subtilis* e hidróxido de cobre fueron más grandes y tuvieron mayor masa. Por lo tanto, un mayor número de aplicaciones de pesticidas en las plantas de tomate reducen las tasas de visitas de abejas en las flores y en consecuencia, la cantidad de granos de polen depositados en los estigmas afectando también la producción de los frutos.

**Palabras clave adicionales:** abejas, carga de polen, *Bacillus subtilis*, trifloxystrobin, tebuconazol, compatibilidad de agroquímicos.

Received for publication: 01-02-2018 Accepted for publication: 30-05-2018

## INTRODUCTION

Tomato crops are associated with a wide range of pathogens: bacteria, fungi, viruses and nematodes present throughout the plant. Currently, at least nine fungal diseases, five bacterial diseases, and six viral diseases have been defined for tomato crops in addition to nematode attacks and eight different types of insect pests (Silva-Neto *et al.*, 2013). Chemical control through the use of pesticides (insecticides, fungicides, nematicides, acaricides) is the main management method in tomato

production systems in Brazil and in the world (Vale *et al.*, 2013).

The annual consumption of agrochemicals in Brazil surpasses 300,000 t of formulated products, representing over 130,000 t of active ingredients. The consumption of agrochemicals has increased 700% in the last 40 years, while the agricultural area grew by only 78%, showing an increase in the consumption of

agrochemicals per production area; 899,000,000 L of pesticides were sprayed in crops in only three Brazilian states (Mato Grosso, Paraná and Rio Grande Sul) (Fletcher and Barnett, 2003; Spadotto *et al.*, 2004; Pignati *et al.*, 2017). However, we emphasize that the inappropriate use of products can be extremely negative for the biological systems found in cultivated areas, which include biotic (pollinators, natural enemies and vegetation) and abiotic components (water and soil) (Freitas *et al.*, 2009).

The main cause of the reduced number of pollinators in crops is the abusive or inappropriate application of agrochemicals. The indiscriminate and irrational use of agrochemicals in agroecosystems can unbalance the population of bees that visit these sites (Rocha, 2012). Insecticides cause acute toxicity, killing bees, and may also cause behavioral changes in individuals, which over time, causes serious damage to colony maintenance (social) or to populations of para-social or solitary bees (Rocha, 2012).

Among pesticides, neonicotinoids present a large problem for the pollination process. This class of insecticides is absorbed by plants, contaminating the pollen and nectar grains that are consumed by pollinators. In addition, even plants that were not treated can absorb chemical residues through soil previously treated with neonicotinoids (Hopwood *et al.*, 2012) because of the long residual action. Gill and Raine (2014) reported that exposure to neonicotinoid and pyrethroid pesticides cause acute and chronic damage to the foraging activity of *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera, Apidae) bees in the United Kingdom, leading to changes in behavior that are detrimental to colony survival and pollination. There is a high consumption of pesticides in Brazil, and their effects on pollinators are still unknown. Tomato crops, although autogamic, are pollinated by several bees. These bees carry out buzz pollination, clinging to the anther cone and vibrating it (leaving a mark on the pollinated flower). The vibration expels pollen from the anthers and increases the deposition of pollen grains on the stigma of the flower (pollen load). Thus, in addition to feeding on pollen from flowers, bees help increase production and the quality of fruits (Silva-Neto *et al.*, 2013; Silva-Neto *et al.*, 2016).

There is general concern about how insecticidal pesticides may affect pollinating bees and agricultural production (Hopwood *et al.*, 2012). However, other classes of agrochemicals have not been studied because they do not affect pollinators directly. Nevertheless,

fungicides can be lethal and/or sublethal to bees (Riedl *et al.*, 2006). Johnson *et al.* (2013) emphasized that fungicides alone are not considered highly toxic to *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae), but also stressed that when this group of pesticides is combined with other groups, the toxicity of the components increases, causing more damage to bees. DeGrandi-Hoffman *et al.* (2015) showed that bees that fed on pollen contaminated with fungicide (Pristine group –pyraclostrobin + boscalid) presented sub-lethal effects of malnutrition, increased amount of viruses and higher pathogen susceptibility. However, Artz and Pitts-Singer (2015) observed that Rovral 4F (iprodione) and Pristine, fungicides commonly used in agricultural crops in California (USA), disturbed the orientation of two solitary bee species (*Osmia lignaria* and *Megachile rotundata*, Hymenoptera, Megachilidae), hindering return trips to the hive. In view of the above, the objective of this study was to estimate the effects of fungicides on the mortality of *Melipona quadrifasciata* bees, on the in-field pollination of flowers and on the formation of tomato fruits.

## MATERIALS AND METHODS

### Study areas

The experiment was conducted under field conditions in the garden of the School of Agronomy of the Federal University of Goiás (16°35'48" S and 49°16'53" W, altitude of 709 m), municipality of Goiânia-GO, from November, 2014 to January, 2015. The climate is classified as Aw according to the Köppen classification and is characterized by a dry winter and rainy summer (Peel *et al.*, 2007). Annual rainfall is approximately 1,487.2 mm. The soil has a medium texture and is classified as Dystrophic Oxisol (Embrapa, 2006).

### Experiment design and implementation

The experiment was conducted in a randomized blocks design, with 10 treatments (Tab. 1) and four replicates (flowerbed A, B, C and D). The "Italian tomato" tomato hybrid (Feltrin®) was used. Each plot consisted of eight plants with 30 cm spacing, two planting lines per plot, and 1m wide flowerbeds. The flowerbeds were covered with black mulch. The seedlings were transplanted 30 d after sowing on November 13, 2014. A bamboo and wire tutoring system was installed in the beds to support the tomato plants, and a



drip irrigation system was used. Liming and fertilization procedures were carried out before planting the seedlings in addition to the cover fertilizer used after planting, following the soil analysis results. The first leaf spray was performed 8 days after transplanting (dat) (November 21, 2014), and the subsequent sprays occurred at weekly or fortnightly intervals (Tab. 1).

### Pollen load of the flowers

The flowers were collected and fixed in FAA 80% (90% formaldehyde, 5% alcohol 80 °GL and 5% acetic acid) in December, 2014 at 70 dat to compare the amount of pollen grains in the stigma of the flowers of the plants exposed to the different treatments ( $n=20$  per treatment). Then, the stigmas were separated and placed in 9N NaOH for 1 h, and were stained with acetic acid and observed under an optical microscope.

The number of pollen grains in each stigma was counted in three fields of vision under an optical microscope (40× magnification). The fields of vision were the two opposing ends of the stigma and its central part (Dafni *et al.*, 2005).

The presence of marks left by the jaws of bees on the anthers of the flowers during their visits was also observed. This mark is an important indication that bees that perform buzz pollination in poricidal

anthers have visited. For this, the anther was observed under a stereoscopic microscope, where the mark was observed for its presence and the distance from the mark until the opening of the anthers' cone was measured using a millimeter paper as reference (Morandin *et al.*, 2001a; 2001b; Silva-Neto *et al.*, 2013).

### Fruit characterization

Three tomatoes were collected per plant, amounting to 15 units per treatment (January, 2015, 90 dat), to evaluate the effect of pollination on fruit formation and production. The mass of the total fresh weight was measured on a precision scale (0.001 g) using gravimetry. The seeds were separated in Petri dishes and counted with a manual counter. The height and diameter of the fruits were evaluated using a digital caliper.

### Bee mortality experiment

The Mandaean bees [*Melipona quadrifasciata* (Lepeletier)] came from the hives of the School of Agronomy of the Federal University of Goiás, Goiânia-GO (16°35'16.39" S and 49°17'32.56" W). The bees were collected using a pooter and each colony was isolated in separate containers. Therefore, each colony was a replicate of the experiment. Samples of 10 to 15 bees

**Table 1. Fungicides used and intervals of application in the different treatments performed with tomato (*Solanum lycopersicum*) crops in the municipality of Goiânia-GO, Brazil.**

Number	Treatments	Active ingredient	Dosage/ha	Foliar applications
T1	Control	No products	-	-
T2	Serenade®	<i>Bacillus subtilis</i>	2.00 L	12 foliar applications at weekly intervals
T3	Serenade®	<i>Bacillus subtilis</i>	2.00 L	Six foliar applications at fortnightly intervals
T4	Kocide®	Copper hydroxide	1.0 kg	12 foliar applications at weekly intervals
T5	Serenade® and Kocide®	<i>Bacillus subtilis</i> + copper hydroxide	2 L + 1 kg	Weekly product alternation, in a total of six applications each
T6	Bion®	Acibenzolar-S-methyl	0.005 kg	Six foliar applications at fortnightly intervals
T7	Nativo® and Serenade®	(Trifloxystrobin + tebuconazole) + <i>Bacillus subtilis</i>	0.75 + 2.00 L	Weekly product alternation, in a total of six applications each
T8	Kocide® and Manzate®	Copper hydroxide + mancozeb	1 + 3 kg	Weekly product alternation, in a total of six applications each
T9	Antracol® and Nativo®	Propineb + (trifloxystrobin + tebuconazole)	3 kg + 0.75 L	Weekly product alternation, in a total of six applications each
T10	Nativo® and Serenade® and Kocide®	(Trifloxystrobin + tebuconazole) + <i>Bacillus subtilis</i> + copper hydroxide	0.75 L + 2 L + 1 kg	Weekly product alternation, in a total of four applications each, and four applications of Kocide® after the others

per container with four replicates were used for each pesticide, plus the control. Thus, there were four samples with about 40 to 50 bees per treatment, amounting to over 200 bees. The collected bees rested for an hour, and the feeding consisted only of sugar syrup before they started feeding on food with added pesticide. The experiment procedure was performed in the laboratory under controlled conditions, with a temperature of 24°C.

Each container consisted of a clear, 1,000-mL plastic pot with part of its lid cut and replaced with a screen for ventilation (Fig 1). The containers were kept in the laboratory in a dark environment with a controlled temperature (20 to 25°C). Four agrochemical fungicides in addition to the control were evaluated, namely: Nativo® (trifloxystrobin+tebuconazole); Mancozeb® (manganese and zinc); Kocide® (copper hydroxide), and Serenade® (*Bacillus subtilis*). For each treatment, 50 mg of product were used in solution with sugar syrup (50%) at 3 mL in a 15 mL tube cap for the first feeding, replacing only the syrup every 24 h (adapted from Johnson *et al.*, 2013).

The mortality and behavior (alimentation, motility and orientation) of the bees were checked every 3 h, except between 10 pm and 7 am. The number of dead bees was recorded for 54 h, and the values were used to calculate the mortality rate (percentage of dead bees divided by the total number of bees).



**Figure 1. Plastic container with fungicide associated with the diet of bees from the species *Melipona quadrifasciata*.**

## Statistical analysis

The significance of the effect of the treatments was determined with an F-Test. A Tukey multiple comparison test with a statistical significance of 95% was used. A principal component analysis (PCA - correlation matrix) was used to characterize the different treatments simultaneously. To perform the analyzes, we used the software Past 2.17.

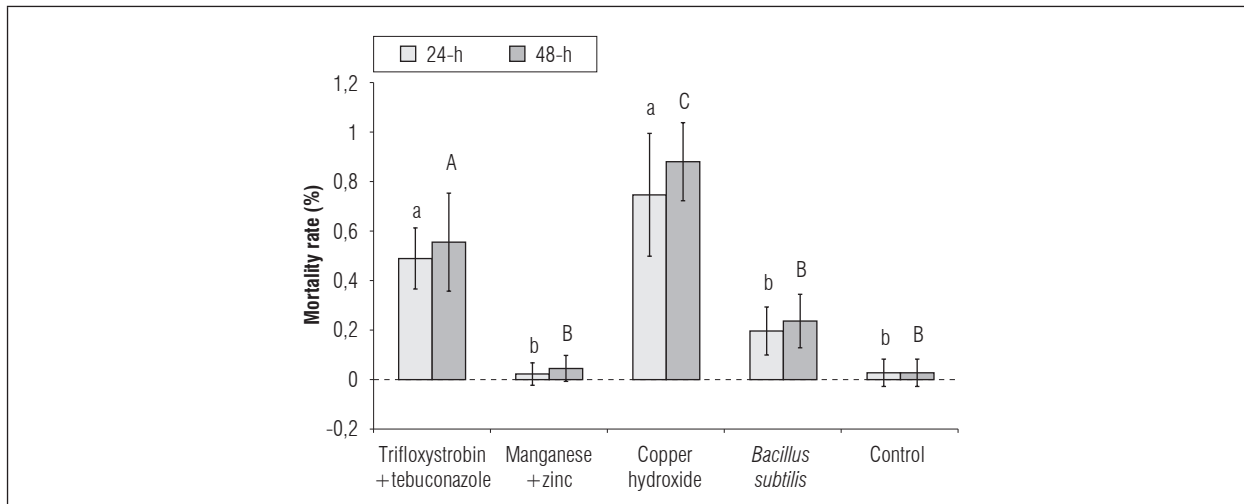
A polynomial regression analysis was carried out to assess the mean mortality rate over time, observing the best fit in the curve and considering a statistical significance of 95% for each treatment. The mortality rates of the different treatments, at 24 and 48 h of evaluation, were compared using an analysis of variance with Tukey's multiple comparison test (95%).

## RESULTS

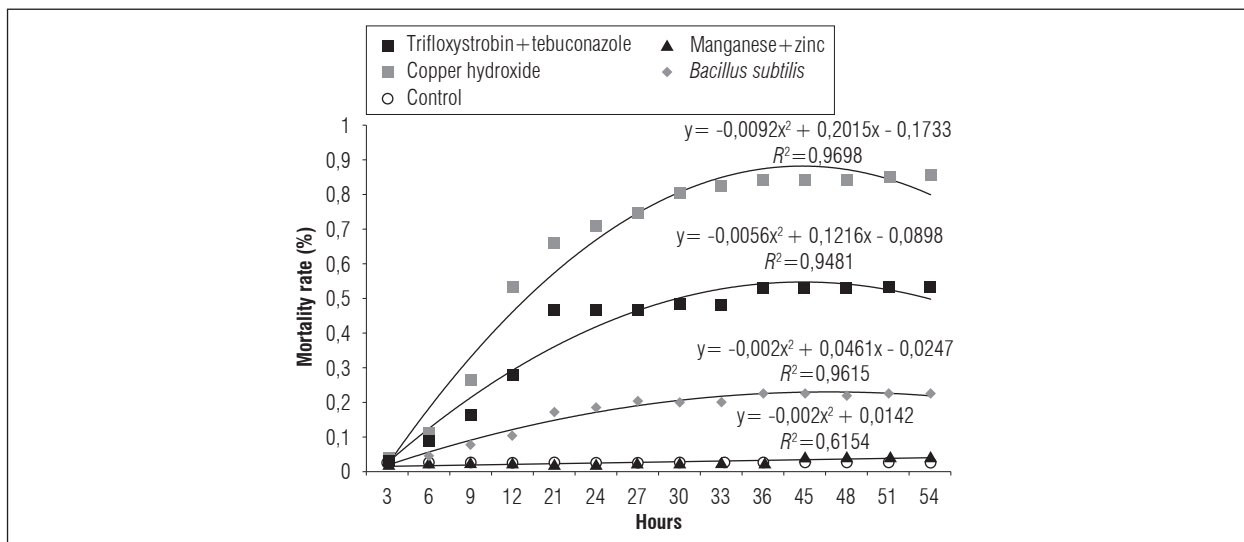
The mortality rate for *Melipona quadrifasciata*, during 24 h of evaluation, was higher for copper hydroxide (75%) and trifloxystrobin+tebuconazole (50%). However, the mortality rate for manganese (2%) and zinc, *B. subtilis* (19%) and the control treatment (2%) did not differ from each other ( $F(2;22)=66,461$ ;  $P=0,0000$ ). The higher mortality rates for the 48-hour evaluation period were observed for copper hydroxide (88%) and trifloxystrobin+tebuconazole (55%), while the mortality rates for the other treatments were the same as that recorded for the 24-h period ( $F=6.72$ ;  $GL=8$ ;  $P=0.0001$ ) (Fig. 2).

The treatments with fungicides, copper hydroxide and trifloxystrobin+tebuconazole exerted an acute effect, with increasing mortality rate up to 24 h, killing most of the bees. From 30 h on, the mortality rate stabilized until reaching 54 h of evaluation. The fungicides that caused the highest mortality, before killing all the bees, caused reactions, such as repetitive behaviors, imbalance and diarrhea (Fig. 3).

The fungicide (active principle), the dosage and the frequency of application all affected bee pollination and, consequently, fruit production ( $F(10;315)=2.823$ ;  $P=0.002$ ). Lower pollen loads in the flower stigma were recorded for treatments 7 (trifloxystrobin+*Bacillus subtilis*), 9 (propineb+trifloxystrobin+tebuconazole) and 10 (trifloxystrobin+tebuconazole+*B. subtilis* + copper hydroxide), consisting of 100 grains of pollen, less than the combination of copper and Mancozeb. All of the treatments had the chemical compound trifloxystrobin although the the combination of compounds varied (Tab. 2).



**Figure 2.** Mortality rate of *Melipona quadrifasciata* in different treatments with fungicides and evaluation periods. Lowercase letters differentiate statistical significance for the treatment evaluated for 24 h, and capital letters for 48 h ( $P \leq 0.05$ ).



**Figure 3.** Average mortality rate of *Melipona quadrifasciata* in different fungicide treatments and 54 h of evaluation.

The same treatments that provided the lowest pollen load also presented the lowest percentage of pollination marks in the flowers. The treatments containing trifloxystrobin reduced the number of pollination marks by 44%. The number of seeds varied among the treatments, different from the pollen load, but still a reflection of pollination. The treatments with the lower amount of seeds were treatment 5 (*B. subtilis* + copper hydroxide), 6 (acibenzolar), and 10 (trifloxystrobin + tebuconazole + *B. subtilis* + copper hydroxide). Despite exhibiting the lowest pollen load, treatment 9 (trifloxystrobin + *B. subtilis*) provided one of the highest number of seeds, with gains over 24%,

as compared to that obtained in the worst treatment (T6 or acibenzolar-S-methyl).

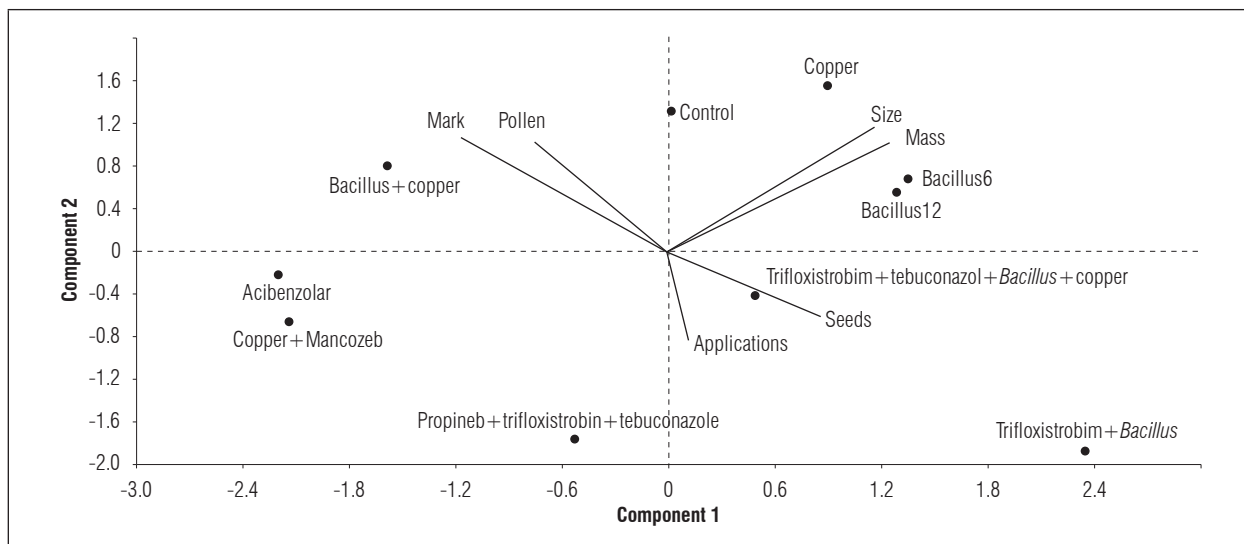
The treatments that provided greater production in mass and larger fruits were treatment 1 (control), 2 (*B. subtilis* 12), 3 (*B. subtilis* 6), 4 (copper hydroxide), 7 (trifloxystrobin + *B. subtilis*) and 10 (trifloxystrobin + tebuconazole + *B. subtilis* + copper hydroxide). The better treatments, in regards to all of the variables assessed, were the control treatment, the biological interventions (*B. subtilis* 6 and 12) and the treatments using copper hydroxide. Treatment 10, with trifloxystrobin, tebuconazole, *B. subtilis* and copper, also

presented gains compared to the treatments that used the same chemical without *Bacillus*. Treatment 6 (acibenzolar), 8 (copper hydroxide+manganese and zinc) and 9 (propineb+trifloxystrobin+tebuconazole) provided the worst results for pollen load, seed and fruit mass, except when combined with *B. subtilis*.

The agrochemical application frequency was important for bee mortality and tomato production. A higher number of applications of a given treatment can cause a lower occurrence of pollination marks and pollen grains on the stigma and lead to fruit with a lower number of seeds, mass, and size (Fig. 3 and 4).

**Table 2. Treatments carried out on the tomato plants (*Solanum lycopersicum*) and results obtained for the pollen load (Pollen), pollination marks (Marks), mark distance, number of seeds, mass, height and width (Height×Width). Means with different letters indicate significant difference according to the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ) ( $F(10,315)=2.823$ ;  $P=0.002$ ).**

Treatment	Active ingredient	Pollen	Marks (%)	Number of seeds	Mass (g)	Height×Width (Size; mm)
T1	-	164.77±20.41 a	0.92±0.09 a	205.77±20.33 a	153.04±11.07 a	3,821.28±480.56 ab
T2	<i>Bacillus subtilis</i>	143.25±29.45 a	0.89±0.15 a	203.23±46.71 b	167.54±25.68 b	3,943.46±610.49 ab
T3	<i>Bacillus subtilis</i>	168.79±39.31 a	0.85±0.19 a	225.58±90.30 b	164.51±15.0 b	3,886.42±605.60 ab
T4	Copper hydroxide	168.35±41.98 a	0.96±0.06 b	201.35±22.36 b	167.85±32.49 b	4,005.5±626.16 a
T5	<i>Bacillus subtilis</i> and copper hydroxide	205.46±15.92 b	0.96±0.05 b	177.48±18.52 c	145.30±17.16 ac	3,731.71±492.96 bc
T6	Acibenzolar-S-methyl	147.68±24.18 a	0.97±0.21 b	174.16±25.93 c	137.35±29.12 c	3,537±613.83 c
T7	(Trifloxystrobin+tebuconazole) <i>Bacillus subtilis</i>	122.09±30.88 c	0.66±0.28 c	233.28±36.26 a	155.70±4.60 a	3,734.5±326.52 bc
T8	Copper hydroxide +Mancozeb	210.15±77.67 b	1±0.0 b	221.34±37.64 a	134.20±17.68 c	3,487.92±448.03 c
T9	Propineb+(trifloxystrobin+tebuconazole)	116.19±20.37 c	0.88±0.10 a	204.25±31.71 ab	139.50±18.76 c	3,595.23±537.39 c
T10	(Trifloxystrobin+tebuconazole) + <i>Bacillus subtilis</i> +copper hydroxide	110.74±12.35 c	0.88±0.12 a	190.10±21.02 bc	151.84±17.80 a	3,785.21±452.03 bc



**Figure 4. Principal components analysis with the different fungicide treatments, pollination characteristics and fruit yield in tomato (*Solanum lycopersicum*) (1<sup>st</sup> Component - Pollen: 41.46%; 2<sup>nd</sup> Component - Mark: 23.38%; Seed: 16.53%; Mass: 15.17%; Fruit size: 2.73% and Applications: 0.72%).**

## DISCUSSION

The results on the mortality rate of *Melipona quadrifasciata* is congruent with the lethal dose effects ( $LD_{50}$ ) of some fungicides described for *Apis mellifera* as described in the package leaflet of the studied pesticides. The fungicide Kocide® (copper hydroxide-based) had a  $LD_{50}$  48 h after the intake of only  $8.15 \mu\text{g kg}^{-1}$ . However, the same lethal dose for contact was  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ . The fungicide Nativo® (trifloxystrobin + tebuconazole-based) exhibited a  $LD_{50}$  for ingestion of  $273.86 \mu\text{g}/\text{bee}$  and  $298.4 \mu\text{g}/\text{bee}$  for contact. Mancozeb presented a  $LD_{50}$  of  $100 \mu\text{g}/\text{bee}$ , without reference to contact or ingestion, as described in the leaflet of each pesticide. The units may vary since they are established by the manufacturer.

Copper is a widely used component in agriculture in the form of sulfates and hydroxides and is allowed in the production of organic foods because it is considered non-toxic and not harmful to the environment. However, this statement has been challenged in regards to bees. In this study, the toxicity and mortality of the bees as the result of the ingestion of copper (copper hydroxide) were considered high, even when compared with trifloxystrobin and tebuconazole based products. Barbosa *et al.* (2015) studied the effects of copper-based fungicides on bees in bioassays with the stingless bee *Friesella schrotkyi* (Friese) and reported high mortality rates for worker bees, but low rates when compared to other pesticides, such as spinosad (insecticide).

The fungicides evaluated in this study with the highest *M. quadrifasciata* mortality rates are considered as lethal as some insecticides that are more harmful to bees. Jacob *et al.* (2013) tested fipronil in *Scaptotrigona postica* and Costa *et al.* (2015) tested imidacloprid in *M. scutellaris*; both found mortality results similar to that reported in this study for fungicides. This shows that fungicides can be as harmful to bees as insecticides even though that is not their purpose. Here, we point out that, even though they are different species or different methodologies, these results are important, showing the impacts of agrochemicals on bees.

The results obtained in this study only show the acute effects on bees, occurring approximately 50 h after contact of the bees with the fungicide. Chronic effects may also occur, but should be investigated more thoroughly. The fungicides tested on *M. quadrifasciata* were only evaluated by ingestion with

sugar syrup since sole contact of the product with the exoskeleton of the insect may cause other effects, such as symptoms of malnutrition, susceptibility to pathogens, and orientation disturbance in flight and foraging. Agrochemicals, even when used in low frequency or concentration levels, may cause lethal or sublethal effects, with behavioral changes that affect pollinator choices (Thompson, 2003).

Other products, such as Serenade® (based on *B. subtilis*) and Bion® (acibenzolar-S-methyl), did not show predetermined  $LD_{50}$  for any bee species (including *Apis mellifera*). Ngugi *et al.* (2005) used *Apis mellifera* as vectors of *Bacillus subtilis* and pollinators of blueberries in a greenhouse. In this case, *B. subtilis* was used to fight a fungus common in the culture, *Monilinia vaccinii-corymbosi* (Reade) Honey.

Copper hydroxide (Kocide®) is a pesticide with a high mortality rate among *M. quadrifasciata* bees, but did not considerably reduce the number of bite marks in the anthers of the tomato flowers. This lack of bee visitation marks on the tomato flowers may have been due to the residue of the pesticide remaining on the flowers as a powder and not as a solution (as the applied in this study), which may reduce the product's potential harm to insects. Kocide® did not affect bee visitation in this research, but this does not mean that residue in flowers cannot harm bees after pollen collection, with lethal or sub-lethal effects on bee development.

Unlike the toxicity presented by copper hydroxide, Mancozeb® (Carbamate with manganese and zinc salts) was not toxic for *M. quadrifasciata*, providing results similar to the control treatment. If Mancozeb® is considered efficient in controlling fungal infections in tomato, it is an agrochemical option with less impact on pollinating agents.

For pollen load, the alternating trifloxystrobin + tebuconazole and *B. subtilis* + copper hydroxide applications reduced the visitation effect and increased pollination, as compared to the application of only trifloxystrobin + tebuconazole. The concern about the effects of pesticides on pollinating bees is almost always associated with insecticides because of their direct effect on insects (Carvalho *et al.*, 2009). Still, fungicides comprise a large class of chemicals widely used in agriculture, especially in tomato crops (Vale *et al.*, 2013).

Sanchez-Bayo and Goka (2014) studied pollen grains contaminated with agrochemicals and found that



fungicides are more frequent in contaminated pollen. This finding reinforces the need for specific studies on the effect of fungicides on pollinating bees in agricultural crops. Thus, this biological control was efficient in fighting fungal diseases and did not affect the bees that pollinated the crop. Ngugi *et al.* (2005) reported that *B. subtilis* did not affect the deposition of pollen grains on stigma, nor the growth of the pollen tube, meaning pollination occurred as expected under natural conditions. Bees are insects that naturally interact with fungi and microorganisms. When these microorganisms are not directly pathogenic to bees, the groups may interact in equilibrium (Mcfrederick *et al.*, 2014). Therefore, the interaction between *B. subtilis* and bees may be harnessed for agricultural purposes (Park *et al.*, 2013).

Pettis *et al.* (2013) detected about 35 agrochemicals in pollen grains from almond, apple, blueberry, cranberry, pumpkin, melon and cucumber crops, most of which were insecticides followed by fungicides. The authors concluded that a greater amount of pesticide on pollen leads to an increased chance of pollinators being infected by the fungus *Nosema* spp., which is considered very harmful to bees (*Apis mellifera* and natives). Thus, they highlighted the relevance of verifying sub-lethal effects of fungicides and other products used in agriculture on bees.

Some fungicides can have a major impact on crop pollination by reducing the number of visits to crop flowers, by repelling bees or affecting plant physiology and, consequently, reducing pollen viability and availability of nutritious food (Solomon and Hooker, 1989; Riedl *et al.*, 2006). Captan® is a fungicide widely used in apple trees and may cause reduced visitation by reducing the attractiveness of flowers to bees through the presence of harmful chemical compounds. Thus, Captan® reduces foraging, causes morphogenic defects in adults exposed in the larval stage (on legs, wings and body) and increases larval mortality (Mussen *et al.*, 2004; Freitas and Pinheiro, 2010).

In organic tomato crops in Piauí, 76% more bees were found than in conventional crops that use pesticides. This shows that the products may be affecting the pollinator community and visitation, with lethal or sublethal effects (Santos and Nascimento, 2011). The use of pesticides during flowering in the cultivation of mangoes (*Mangifera indica*) in the sub-middle San Francisco Valley reduced the frequency of bee visits by 50% and diptera by 20% (Siqueira, 2008).

In this study, the frequency of the application of fungicides was relevant in the tomato crop in terms of bees. The application frequency was related to seed production and fruit characteristics in the principal components analysis. The agrotoxic agent applied at a higher frequency, even when biological (*Bacillus subtilis*), reduced bee visitation more intensely than products considered more toxic (acibenzolar-S-methyl) applied with a lower frequency. This pattern reinforces the relationship between the application frequency of agrochemicals and manufacturer's recommendation, making it vital to check the period established by the manufacturer for the product to be re-applied to a crop. The application frequency of agrochemicals, time of day and forms of application are relevant for the effects that products will have on targets (insect pests and fungi) and on non-target insects, such as bees (Franceschinelli *et al.*, 2017). These non-target effects are relevant research topics for future studies. Thus, a greater number of applications of pesticides on tomato flowers leads to a lower number of visits from bees to flowers. Consequently, there will be a smaller amount of pollen grains deposited on the stigmas, affecting fruit quality and yield (Nunes-Silva *et al.*, 2013; Silva-Neto *et al.*, 2013).

The effects of different pesticides differ among products from different classes (e.g., insecticides, fungicides, herbicides and others) in terms of their mechanisms of action on bees. Insecticides affect bees as neurotoxic agents, affecting the transmission of the nerve impulse, interferes with growth, damaging the transformation of the stages of the insects, and affects metabolic processes, such as cellular respiration and death. For the fungicides, the direct and indirect effects verified for the bees and the mechanisms of action are not known (Tomé *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2016). Thus, more research on pesticides (insecticides and other classes) and agricultural crop pollinators are needed.

In conclusion, Kocide (copper hydroxide) and Nativo (trifloxystrobin and tebuconazole) provided the highest mortality rates for *Melipona quadrifasciata*. The treatments with Mancozeb and Serenade and the control treatment did not differ from each other.

trifloxystrobin and tebuconazole were the most repellent active ingredients for bee pollination in the tomato crop. Fruits from the plants treated with *Bacillus subtilis* and copper hydroxide were larger and had higher mass.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for the support provided by the Federal Institute of Goiás (IFG) for carrying out the research addressed in this paper and for resources for its publication. The first author is agroecologist technologist in the same institution.

**Conflict of interests:** the manuscript was prepared and reviewed with the participation of the authors, who declare that there exists no conflict of interest that puts the validity of the presented results at risk.

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Artz, D.R. and T.L. Pitts-Singer. 2015. Effects of fungicide and adjuvant sprays on nesting behavior in two managed solitary bees, *Osmia lignaria* and *Megachile rotundata*. PLoS One 10, e0135688. Doi: 10.1371/journal.pone.0135688
- Barbosa, W.F., G. Smagghe, and R.N.C. Guedes. 2015. Pesticides and reduced-risk insecticides, native bees and pantropical stingless bees: pitfalls and perspectives. Pest. Manag. Sci. 71(8), 1049-1053. Doi: 10.1002/ps.4025
- Carvalho, S.M., G.A. Carvalho, C.F. Carvalho, J.S.S. Bueno-Filho, and A.P.M. Baptista. 2009. Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). Arq. Inst. Biol. 76(4), 597-606.
- Costa, L.M., T.C. Grella, R.A. Barbosa, O. Malaspina, and R.C.F. Nocelli. 2015. Determination of acute lethal doses (LD<sub>50</sub> and LC<sub>50</sub>) of imidacloprid for the native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). Sociobiol. 62(4), 578-582. Doi: 10.13102/sociobiology.v62i4.792
- Dafni, A., E. Pacini, and M. Nepi. 2005. Pollen and stigma biology. pp 83-142. In: Dafni, A., P. Kevan, and B. Husband (eds.). Practical pollination biology. Ontario, Canada.
- Degrandi-Hoffman, G., Y. Chen, E.W. Dejong, M.L. Chambers, and G. Hidalgo. 2015. Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. J. Econ. Entomol. 251(6), 1-11. Doi: 10.1093/jee/tov251
- Embrapa. 2006. Sistema brasileiro de classificação de solos. 2<sup>nd</sup> ed. Rio de Janeiro, Brazil.
- Fletcher, M. and L. Barnett. 2003. Bee poisoning incidents in the United Kingdom. Bull. Insectol. 56, 141-145.
- Franceschinelli, E.V., M.A. Elias, L.L. Bergamini, C.M. Silva-Neto, and E.R. Sujii. 2017. Influence of landscape context on the abundance of native bee pollinators in tomato crops in Central Brazil. J. Ins. Cons. 21(4), 715-726. Doi: 10.1007/s10841-017-0015-y
- Freitas, B.M. and J.N. Pinheiro. 2010. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. Oecologia 14, 282-298. Doi: 10.4257/oeco.2010.1401.17
- Gill, R.J. and N.E. Raine. 2014. Chronic impairment of bumblebee natural foraging behaviour induced by sublethal pesticide exposure. Funct. Ecol. 28(1), 1459-1471. Doi: 10.1111/1365-2435.12292
- Hopwood, J., M. Vaughan, M. Shepherd, D. Biddinger, E. Mader, S.H. Black, and C. Mazzacano. 2012. Are neonicotinoids killing bees? A review of research into the effects of neonicotinoid insecticides on bees, with recommendations for action. Xerces Society for Invertebrate Conservation, Portland, OR, USA.
- Jacob, C.R.O., H.M. Soares, S.M. Carvalho, R.C.F. Nocelli, and O. Malaspina. 2013. Acute toxicity of fipronil to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 90(1), 69-72. Doi: 10.1007/s00128-012-0892-4
- Johnson, R.M., L. DahlGren, B.D. Siegfried, and M.D. Ellis. 2013. Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). PLoS One 8, e54092. Doi: 10.1371/journal.pone.0054092
- Lima, M.A.P., G.F. Martins, E.E. Oliveira, and R.N.C. Guedes. 2016. Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. J. Comp. Physiol. A. 202(9-10), 733-747. Doi: 10.1007/s00359-016-1110-3
- McFrederick, Q.S., G. Ulrich, R. Mueller, and R. James. 2014. Interactions between fungi and bacteria influence microbial community structure in the *Megachile rotundata* larval gut. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 281(1779), 1-8.
- Morandin, L.A., T.M. Lavery, and P.G. Kevan. 2001a. Bumble bee (Hymenoptera: Apidae) activity and pollination levels in commercial tomato greenhouses. J. Econ. Entomol. 94(2), 462-467. Doi: 10.1603/0022-0493-94.2.462
- Morandin, L.A., T.M. Lavery, and P.G. Kevan. 2001b. Effect of bumble bee (Hymenoptera: Apidae) pollination intensity on the quality of greenhouse tomatoes. J. Econ. Entomol. 94(1), 172-179. Doi: 10.1603/0022-0493-94.1.172
- Mussen, E.C.M., I. Julio, E. Lopez, and C.Y. Peng. 2004. Effects of selected fungicides on growth and development of larval honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Environ. Entomol. 33(5), 1151-1154. Doi: 10.1603/0046-225X-33.5.1151
- Ngugi, H.K., S. Dedej, K.S. Delaplane, A.T. Savelle, and H. Scherm. 2005. Effect of flowerapplied Serenade biofungicide (*Bacillus subtilis*) on pollination-related variables in rabbiteye blueberry. Biol Control 33(1), 32-38. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2005.01.002

- Nunes-Silva, P., M. Hnrcir, L. Shipp, V.L. Imperatriz-Fonseca, and P.G. Kevan. 2013. The behaviour of *Bombus impatiens* (Apidae, Bombini) on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill., Solanaceae) flowers: pollination and reward perception. *J. Pollinat. Ecol.* 11(5), 33-40.
- Park, H.H., J.J. Kim, K.H. Kim, and S.G. Lee. 2013. Dissemination of *Bacillus subtilis* by using bee-vectoring technology in cherry tomato greenhouses. *Korean J. Appl. Entomol.* 52(4), 357-364. Doi: 10.5656/KSAE.2012.09.0.046
- Peel, M.C., L.F. Brian, and T.A. McMahon. 2007. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci. Discuss.* 4(2), 439-473. Doi: 10.5194/hessd-4-439-2007
- Pettis, J.S., E.M. Lichtenberg, M. Andree, J. Stitzinger, and R. Rose. 2013. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS One* 8, e70182. Doi: 10.1371/journal.pone.0070182
- Pignati, W.A., A.N.D.S. Lima, S.S.D. Lara, M.L.M. Correa, J.R. Barbosa, L.H.D.C. Leão, and M.G. Pignatti. 2017. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. *Cien. Saude Colet.* 22(10), 3281-3293. Doi: 10.1590/1413-812320172210.17742017
- Riedl, H., E. Johansen, L. Brewer, and J. Barbour. 2006. How to reduce bee poisoning from pesticides. Oregon State University; University of Idaho; Washington State University, Corvallis, OR, USA.
- Rocha, M.C.L.S.A. 2012. Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília, Brazil.
- Rodrigues, C.G., A.P. Kruger, W.F. Barbosa, and R.N.C. Guedes. 2016. Leaf fertilizers affect survival and behavior of the neotropical stingless bee *Friesella schrottkyi* (Meliponini: Apidae: Hymenoptera). *J. Econ. Entomol.* 109(30), 1001-1008. Doi: 10.1093/jee/tow044
- Sanchez-Bayo, F. and K. Goka. 2014. Pesticide residues and bees - a risk assessment. *PLoS ONE* 9, e94482. Doi: 10.1371/journal.pone.0094482
- Santos, A.B. and F.S. Nascimento. 2011. Diversidade de visitantes florais e potenciais polinizadores de *Solanum lycopersicum* (Linnaeus) (Solanales: Solanaceae) em cultivos orgânicos e convencionais. *Neotrop. Biol. Conserv.* 6a(3), 162-169.
- Silva-Neto, C.M., F.G. Lima, B.B. Gonçalves, L.L. Bergamini, B.A. Bergamini, M.A.S. Elias, and E.V. Franceschinelli. 2013. Native bees pollinate tomato flowers and increase fruit production. *J. Pollinat. Ecol.* 11(6), 41-45.
- Silva-Neto, C.M., E.V. Franceschinelli, L.L. Bergamini, M.A.S. Elias, J.M. Morais, G.L. Moreira, B.A. and Bergamini. 2016. High species richness of native pollinators in brazilian tomato crops. *Braz. J. Biol.* 77(3), 506-513. Doi: 10.1590/1519-6984.17515
- Siqueira, K.M.N. 2008. Estudo comparativo da polinização de *Mangifera indica* L. em cultivo convencional e orgânico na região do Vale do Submédio do São Francisco. *Rev. Bras. Fruti.* 30, 303-310. Doi: 10.1590/S0100-29452008000200006
- Solomon, M.G. and K.J.M. Hooker. 1989. Chemical repellents for reducing pesticide hazard to honeybees in apple orchards. *J. Apic. Res.* 28(4), 223-227. Doi: 10.1080/00218839.1989.11101188
- Spadotto, C.A., M.A.F. Gomes, L.C. Luchini, and M.M. Andrea. 2004. Monitoramento de risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Jaguariuna, São Paulo-SP, Brazil.
- Thompson, H.M. 2003. Behavioural effects of pesticides in bees - their potential for use in risk assessment. *Ecotoxicol.* 12(1-4), 317-330. Doi: 10.1023/A:1022575315413
- Tomé, H.V.V., W.F. Barbosa, A.S. Correa, L.M. Gontijo, G.F. Martins, and R.N.C. Guedes. 2015. Reduced risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on survival and activity. *Ann. Appl. Biol.* 167(2), 186-196. Doi: 10.1111/aab.12217
- Vale, F.X.R., C.A. Lopes, and M.A.R. Alvarenga. 2013. Doenças fúngicas, bacterianas e causadas por nematoides. pp. 275-326. In: Alvarenga, M.A.R. (ed.). *Tomate. Produção em campo, casa de vegetação e hidroponia.* Editora Universitária de Lavras, Lavras-MG, Brazil.

# Detección de plantas asintomáticas de *Solanum lycopersicum* L. infectadas con *Fusarium oxysporum* usando espectroscopia de reflectancia VIS

Detection of asymptomatic *Solanum lycopersicum* L. plants infected with *Fusarium oxysporum* using reflectance VIS spectroscopy

JUAN CARLOS MARÍN-ORTIZ<sup>1</sup>  
LILLIANA MARÍA HOYOS-CARVAJAL<sup>1</sup>  
VERÓNICA BOTERO-FERNÁNDEZ<sup>2</sup>



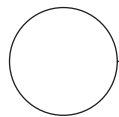
**Cultivo de tomate en producción.**

Foto: L.M. Hoyos-Carvajal

## RESUMEN

Las plantas asintomáticas son reservorios de patógenos, ya que pueden permanecer infectadas la mayor parte de su ciclo de desarrollo, convirtiéndose en fuente de contaminación para el resto del cultivo. El objetivo de este estudio fue evaluar un método de detección y discriminación de dos cepas de *Fusarium oxysporum* en tomate usando espectroscopia. La enfermedad en las plantas de tomate inoculadas con la cepa aislada de gulupa (F05) fue mayor a la observada en la cepa aislada de tomate (F07), presentando valores de 60,0% (11 días) y 81,8% (22 días); la cepa F07 presentó incidencias de 30,0 y 64,3% en ambas mediciones. La planta infectada con la cepa F05 fue mejor discriminada en el periodo de incubación de la enfermedad en ambos periodos de tiempo en los Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis Discriminantes Lineales (LDA) realizados con los controles en comparación con la cepa F07. Estos resultados sugieren que la espectroscopia de reflectancia VIS es un método sensible y confiable que puede ser adecuado para el diagnóstico temprano de enfermedades en plantas.

**Palabras clave adicionales:** enfermedades, espectroscopia VIS/NIR, métodos de detección, reflectancia, análisis multivariado.



<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín (Colombia). ORCID Marín-Ortiz, J.C.: 0000-0002-1334-4721; ORCID Hoyos-Carvajal, L.M.: 0000-0003-0980-5035

<sup>2</sup> Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia, Medellín (Colombia). ORCID Botero-Fernández, V.: 0000-0002-6964-239X

<sup>3</sup> Autor para correspondencia. juancarlosmo@gmail.com

## ABSTRACT

Asymptomatic plants are reservoirs of pathogens because they can remain infected most of the development cycle, becoming a source of contamination for the rest of the crop. The objective of this study was to evaluate a method of detection and discrimination of two *F. oxysporum* isolates on tomato plants using reflectance spectroscopy in the VIS region. The incidence of the fungal isolate from the purple passion fruit plants (F05) was greater than that observed in the strain isolated from the tomato plant (F07), with values of 60.0% at 11 days and 81.8% at 22 days; the incidence present in the plants with strain F07 was 30.0% and 64.3% in the evaluated period. The F05 strain showed better grouping in both periods of time, both in the Principal Component Analysis and Linear Discriminant Analysis, than the controls, as did the F07 strain. These results suggest that reflectance spectroscopy in the VIS is a sensitive and reliable method that may be suitable for early diagnosis of plant diseases.

**Additional key words:** diseases, VIS/NIR spectroscopy, detection methods, reflectance, multivariate analysis

Fecha de recepción: 19-09-2017 Aprobado para publicación: 30-05-2018

## INTRODUCCIÓN

*Fusarium oxysporum* Schltld. 1824, es una de las especies morfológicamente más diversas y ampliamente distribuida del género *Fusarium* (Baayen *et al.*, 2000). Esta especie, se constituye en un complejo, con numerosas formas especiales las cuales son morfológicamente idénticas, solo pueden ser diferenciadas por el tipo de planta(s) atacada(s) (Leslie y Summerell, 2006), con alrededor de 100 formas especiales. *Fusarium* se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento y morfología muy variable, predominando dos tipos primordiales, una micelial y una pionotal (Garcés *et al.*, 2001). En general, la mayoría de cepas patógenas pueden atacar las plantas de tomate a lo largo de todo su ciclo de desarrollo, produciendo síntomas de marchitamiento, acompañada del amarillamiento parcial de las hojas y el doblamiento de los brotes de la planta enferma. Una característica que permite diagnosticar y diferenciar rápidamente esta enfermedad es la coloración blanquecina, amarillenta o marrón en los haces vasculares; adicionalmente, se puede presentar enanismo en los brotes y disminución del crecimiento general de la planta (Garcés *et al.*, 1999).

Sin embargo, los síntomas exteriores en la planta hospedera no siempre se detectan rápidamente, o esta puede permanecer asintomática durante su ciclo de desarrollo; esto implica que una planta infectada sea en ocasiones difícil de detectar y pueda ser una hospedera asintomática que actúe como reservorio del patógeno, convirtiéndose en una fuente de contaminación

para el resto del cultivo (Kolander *et al.*, 2012). En la actualidad se utiliza una gran cantidad de técnicas de detección de enfermedades de plantas, pero éstas presentan varias limitaciones que disminuyen su eficiencia al usarlas para obtener resultados que conduzcan a decisiones de control. Por ejemplo, la detección basada en la observación de síntomas en enfermedades vasculares implica que cuando hay disturbios visibles el hongo u organismo patógeno haya invadido ya el tejido vascular. Los métodos de detección que se basan en técnicas moleculares, microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión, bioensayo para la detección de virus, y la serología, tienen buenos niveles de precisión, pero requieren la destrucción de las muestras, consumen tiempo, son costosos y requieren alta capacitación profesional, por lo que su uso es modesto, implicando imprecisión porque la enfermedad se diagnostica usando tejidos o plantas completas que se destruyen, no siendo óptimas en el sentido estricto de detección temprana y en tiempo de avance de enfermedades de plantas (Sankaran *et al.*, 2011).

Es por estas razones, y a pesar de la disponibilidad de estas técnicas, un sistema de detección temprana de la enfermedad basado en técnicas de espectroscopía puede ayudar a disminuir las pérdidas causadas en los cultivos y evitar una mayor propagación de las enfermedades, evitando por ejemplo la siembra de unidades de plantas portadoras del patógeno, con más rapidez, sensibilidad, selectividad y sin demandar la destrucción de muestras requeridas para el análisis (Chaerle



y Van der Straeten, 2000). En la última década se han realizado muchos estudios en los cuales fue aplicada la espectroscopía y particularmente, el uso de radiación VIS en la detección de enfermedades en plantas sintomáticas (Sankaran *et al.*, 2011; Abu-Khalaf y Salman, 2014; Szuvandzsiev *et al.*, 2014); sin embargo, aquellos enfocados en la detección de enfermedades en plantas asintomáticas o estudios enfocados a enfermedades que pueden “enmascarar” los síntomas usan la espectrometría de reflectancia en proporciones relativamente bajas. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar un método de detección y discriminación de la respuesta espectral debida a cambios fisiológicos en plantas de tomate asintomáticas infectadas con dos cepas de *F. oxysporum* usando espectroscopía de reflectancia en la región visible (VIS).

## MATERIALES Y METODOS

### Material vegetal

En este estudio se usó la variedad de tomate, tipo Chonto Santa Cruz®, resistente a *F. oxysporum*. Las semillas fueron plantadas en bandejas de germinación de 76 pozos con turba estéril como sustrato y se mantuvieron en una cámara de siembra con temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , humedad relativa de  $60 \pm 10\%$  y fotoperiodo de 12 h con luz blanca fluorescente, con una intensidad entre 40 a  $80 \text{ mol}^{-2} \text{ s}^{-1}$  durante el tiempo de los experimentos. Las plantas se regaron diariamente y se fertilizaron una vez por semana con una solución hidropónica que contenía (mili-equivalentes):  $\text{NO}_3$  (12,0),  $\text{PO}_4$  (1,0), K (1,7), Mg (1,5), Ca (2,8) y S (0,5), y en micro-equivalentes, Fe (70,0), Mn (18,0), Zn (7,7), Cu (1,5), B (27,5) y Mo (0,5). A las 4 semanas después de germinadas (sdg) se realizó el procedimiento de inoculación y las plantas se transfirieron a recipientes de  $90 \text{ cm}^3$  que contenían el mismo sustrato que el usado en plantación. Las plantas inoculadas se mantuvieron en las mismas condiciones de cámara de siembra durante el resto del experimento, aumentando las fertilizaciones a dos veces por semana con las mismas concentraciones en macro y micronutrientes (Lafontaine y Benhamou, 2010).

### Preparación de aislamientos de *F. oxysporum*

Se usaron dos cepas de *F. oxysporum* aisladas de hospederos diferentes; la cepa F05 fue aislada de *Passiflora edulis* (gulupa) (cepa A54; Ortiz y Hoyos-Carvajal,

2016) y la cepa F07 fue aislada de plantas de *Solanum lycopersicum* (tomate). Ambas fueron mantenidas en cajas de Petri con agar papa dextrosa (Merck®) PDA +  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de sulfato de estreptomocina (SE). Multiplicándose según las necesidades.

### Inoculación de plantas de tomate antes del trasplante definitivo

Para este experimento se usaron 12 plantas de 4 sdg siguiendo la metodología de inoculación descrita por Ortiz y Hoyos-Carvajal (2016) y 12 plantas control. Se utilizó la concentración  $1 \cdot 10^6$  esporas/mL por cada aislamiento de *Fusarium* de 10 d de cultivo. Cuidadosamente las raíces de las plántulas fueron lavadas con agua de grifo hasta retirar los restos de turba. Luego de la limpieza se hacen heridas (cortes) en las raíces terciarias de todas las plantas que se infectaron con tijeras esterilizadas y se sumergen solo las raíces en 100 mL de la solución de esporas durante 10 min. Las plántulas inoculadas y controles fueron trasplantados a los vasos con turba estéril de  $5 \text{ cm}^3$ . En las plantas control se realizó el mismo procedimiento de las plantas inoculadas, pero solo con agua destilada. Para llevar a cabo los postulados de Koch se realizaron muestreos destructivos a los 11 y 22 días pos-inoculación (dpi).

### Prueba de infectividad

Para confirmar la infección de las plantas se realizaron dos muestreos destructivos, en los estados 1.10 (11 dpi) y el estado 2.20 (22 dpi), según la escala BBCH para las mono y dicotiledóneas (Feller *et al.*, 1995). Se realizó la prueba de infectividad mediante la técnica de indexación en medio PDA + SE a  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  (Ortiz y Hoyos-Carvajal, 2016). A los 5 d después de sembrar los segmentos indexados de tallo en el medio usado se observó la presencia y crecimiento del patógeno.

### Espectroscopia

Para la adquisición de espectros de reflectancia VIS se utilizó un espectroscopio portátil USB2000+ (Ocean Optics, Largo, FL) con una fuente de luz halógena de tungsteno HL-2000-HP (rango de longitud de onda de 360-2.400 nm), un estándar de reflectancia difusa modelo WS-1 (reflectividad  $>98\%$  en el rango de 250-1.500 nm) y una sonda de reflectancia grado premium de  $600 \mu\text{m}$  QR600-7-VID-125F (Ocean Optics, Largo, FL, USA). Las mediciones se realizaron en los estados

fenológicos 1.10 y 2.20 de la planta en las hojas 2 y 3 con la fibra óptica en la cara adaxial obteniéndose cinco espectros por cada hoja. El tiempo de integración utilizado en esta investigación fue de 1 ms, un promedio de 10 lecturas por medición y “tiempo de intervalo” de 2000  $\mu$ s.

### Análisis de datos

La discriminación y comparación de los efectos causados por ambas cepas se llevó a cabo en hojas en el mismo estadio de crecimiento y desarrollo, sólo usándose hojas desarrolladas y de la misma edad (hoja dos de cada planta). Los análisis realizados en los datos de las plantas 22 dpi tienen un mayor muestreo. Intencionalmente, se usó mayor cantidad de plantas, tratando de prever una mortalidad natural que al fin del experimento fue muy baja, por lo que no todas las muestras contienen el mismo número de espectros.

Inicialmente, se realizó una selección de los espectros en la cual se retiraron algunos con ruido (deformados y/o con error de lectura). Estos espectros que mostraron patrones muy diferentes se confirmaron con análisis de los “valores atípicos” identificados en un Análisis de Componentes Principales (PCA) sin tratamiento previo de datos. Después de la eliminación de los espectros con ruido y tratamientos previos, se aplicó la combinación de las transformaciones Corrección Dispersión Multiplicativa (MSC) más la “segunda derivada” como mejor pre-tratamiento, lo que permite una buena agrupación de las plantas en los tratamientos realizados (Isaksson y Naes, 1998). Luego del pre-tratamiento de datos se realizaron los PCA y LDA enfocados a evaluar la posible separación entre plantas infectadas y las de control en diferentes tiempos pos-infección (Fig. 1).

Los espectros de las plantas infectadas con cada cepa de *F. oxysporum* (F05 y F07) se analizaron separados con los controles (no se realizó tratamiento combinando las cepas) y en los dos tiempos pos-infección. El conjunto total de datos tomados de las hojas 2 y 4 de las plantas infectadas y controles se compone de 156 espectros (promedios de cinco espectros tomados por hoja). En este análisis solo se tomaron los 78 espectros correspondientes a la hoja 2 para evitar ruido relacionado con la diferencia en el tiempo de desarrollo de ambas hojas, los cuales fueron medidos desde 10 plantas control, 10 infectadas con la cepa F05 y 10 infectadas con la cepa F07 en el día 11, y 13 controles,

20 infectadas con la cepa F05 y 17 infectadas con la cepa F07 en el día 22. Después de la eliminación de los espectros con ruido y “atípicos” se usaron 64 espectros en total.

## RESULTADOS

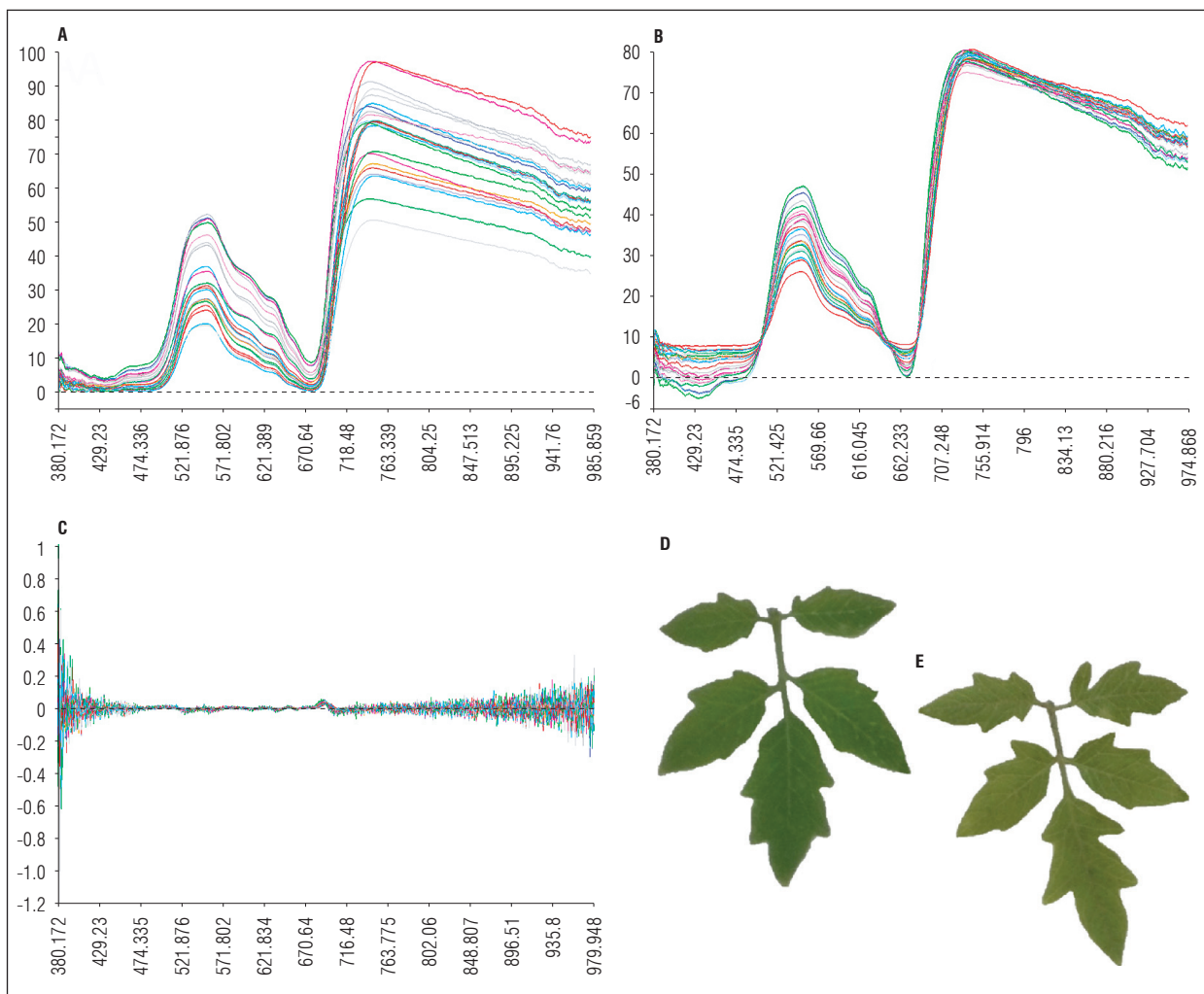
### Confirmación de la infección

Se evaluó la incidencia de la enfermedad en plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* en plantas de tomate con base en el porcentaje de individuos infectados en relación con el total de las plantas inoculadas. La incidencia de la cepa F05, que fue aislada de una planta de gulupa, fue mayor a la observada en la cepa F07 (aislada de una planta de tomate), presentando valores del 60,0% a los 11 d y 81,8% a los 22 d. La cepa F07 presentó incidencias de 30,0% y 64,3% en los tiempos evaluados (11 y 22 d, respectivamente).

### Análisis de datos espectrales

El Análisis de Componentes Principales (PCA) obtenidos de los espectros de las hojas de tomate infectadas con las cepas de *F. oxysporum*, F05 y F07, se agruparon según la cepa y tiempo pos-infección. La cepa F05 presentó mejor agrupamiento en los dos periodos de tiempo pos-inoculación con respecto a los controles (Fig. 2A y 2A') y la cepa F07 (Fig. 2C y 2C'). Sin embargo, la cepa F07 no presentó un agrupamiento claro a los 11 dpi y mejoró considerablemente para a los 22 dpi (Fig. 2B y 2B'). Es importante resaltar que estos resultados son coherentes con los obtenidos en los muestreos destructivos para confirmación de la infección, en la cual se dio mayor porcentaje de infección para la cepa F05 en ambos periodos de tiempo, y la cepa F07 tuvo un porcentaje muy bajo de infección en el día 11 (30%).

El PCA realizado con la cepa F05 junto con sus controles (Fig. 2A y 2A') se emplearon 41 espectros, los componentes principales CP1 y CP2 explican el 66% (CP1=60%, CP2=6%) y 76% (CP1=70%, CP2=6%) de la variabilidad total de los datos en los 11 y 22 dpi, respectivamente. Adicionalmente, se usaron 43 espectros para los PCA realizados con la cepa F07 más los respectivos controles (Fig. 2B y 2B'), en los cuales los CP1 y CP2 solo explican el 29% (CP1=18%, CP2=11%) y 64% (CP1=41%, CP2=23%) en los 11 y 22 dpi, respectivamente. Finalmente, se usaron 22



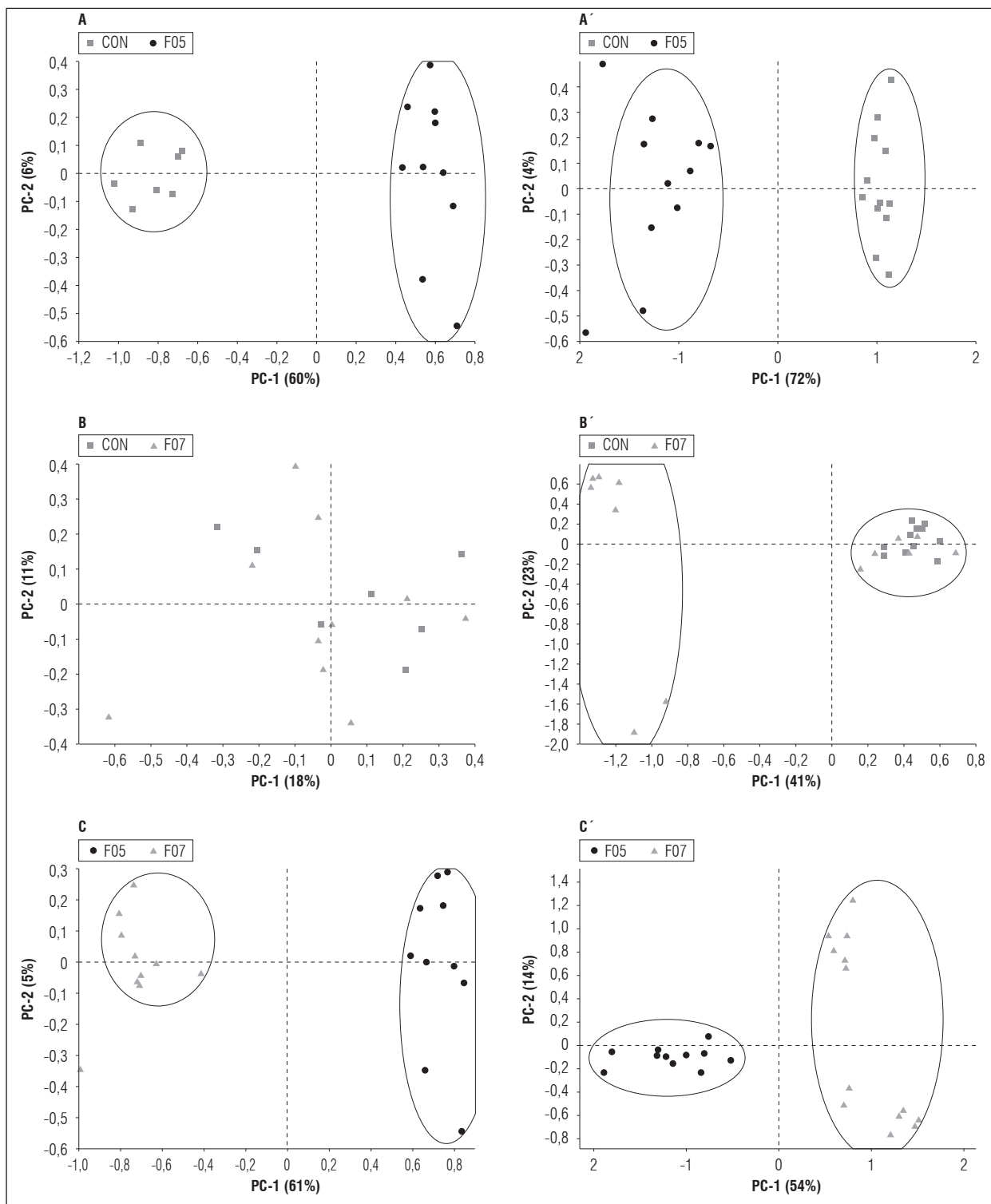
**Figura 1. Ejemplo de datos espectrales usados para los análisis mostrando la diferencia entre los pre-tratamientos aplicados y hojas monitoreadas del día 22 después de inoculación: A. Perfiles espectrales sin transformación; B. Corrección de Dispersión Multiplicativa (MSC); C. MSC + Segunda derivada; D. Hoja de planta control; E. Hoja inoculada.**

espectros de hojas infectadas con la cepa FO5 y 22 de la cepa FO7 para evaluar si el método pudo separar plantas infectadas con aislados diferentes de la misma especie (Fig. 2C y 2C'); en estos PCA, los CP1 y CP2 explicaron el 66% (CP1=61%, CP2=5%) y 68% (CP1=54%, CP2=14%) de la variabilidad total de los datos en los días 11 y 22 dpi, respectivamente.

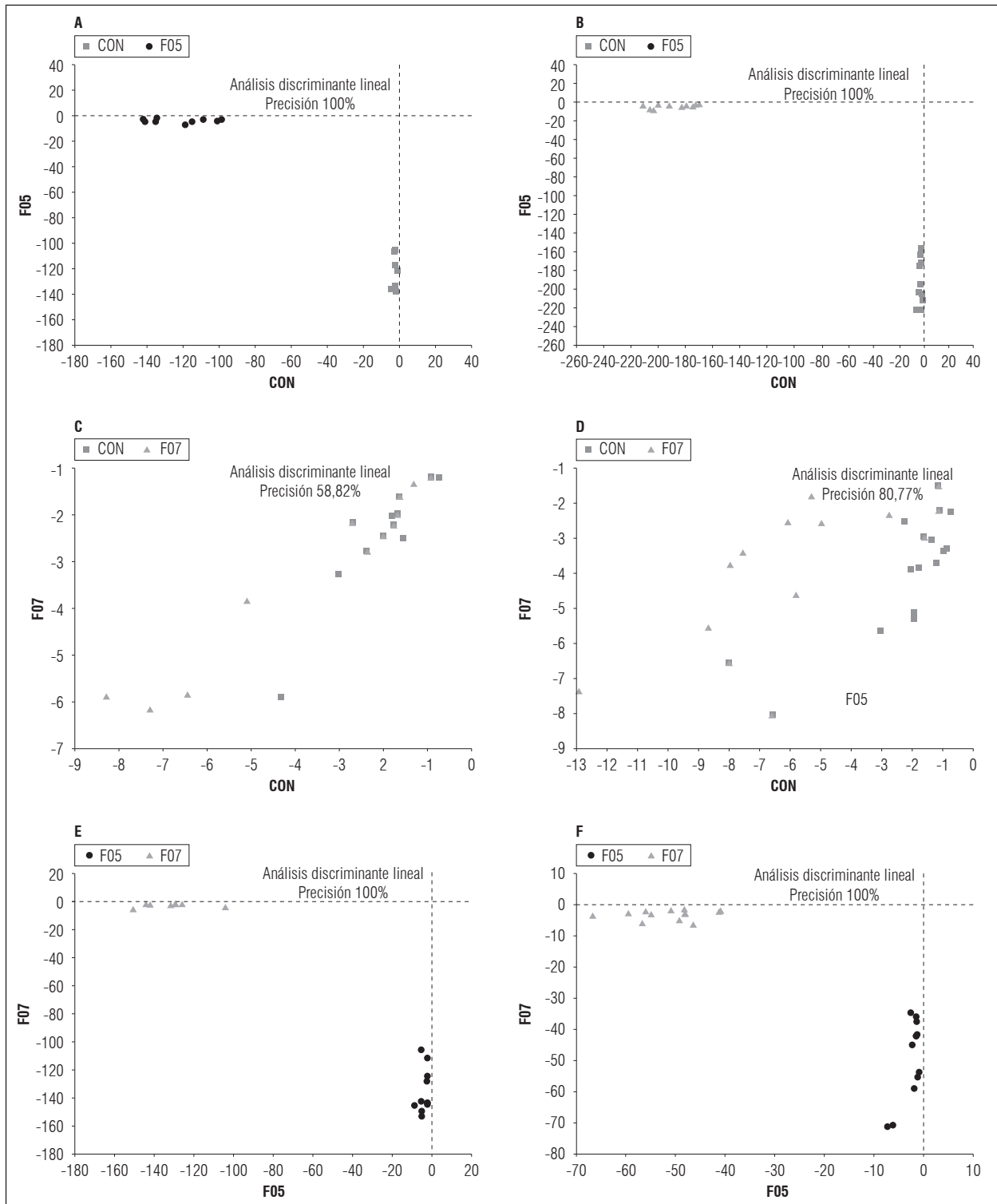
El LDA permitió mejorar la separación de los respectivos tratamientos. Los LDA obtenidos a partir de los datos espectrales de la cepa FO5 (Fig. 3A y 3A') alcanzaron el 100% de precisión obtenidos con la aplicación de cinco componentes principales que predicen las muestras de acuerdo con el tratamiento al cual pertenecen. Por el contrario, los LDA obtenidos de los espectros de las hojas infectadas con la cepa FO7

obtuvieron una precisión de solo 58,82% a los 11 d (Fig. 3B) y un aumento al 80,77% en el día 22 (Fig. 3B') con la misma aplicación de cinco componentes principales para la predicción de muestras.

En las matrices de confusión se puede confirmar que los diferentes modelos clasificaron correctamente todas las plantas infectadas con la cepa FO5 con respecto a las inoculadas con la cepa FO7 y controles en ambos días de medición (precisión el 100%), mientras que para la cepa FO7 el 50% se clasificó como control el día 11 y el 44 % el día 22 (Tab. 1), lo que denota una clara dificultad del modelo en la discriminación entre las plantas no inoculadas y plantas inoculadas con la cepa FO7, las posibles razones serán abordadas en la discusión.



**Figura 2. Análisis de Componentes Principales de espectros de tomate de mesa infectadas con dos cepas de *F. oxysporum* y dos tiempos después de la infección (dpi). A. Cepa F05 a los 11 dpi; A'. Cepa F05 a los 22 dpi; B. Cepa F07 a los 11 dpi; B'. Cepa F07 a los 22; C. Cepas F05 y F07 a los 11 dpi; C'. Cepas F05 y F07 a los 22 dpi.**



**Figura 3.** Análisis discriminantes lineales de espectros de tomate de mesa infectadas con dos cepas de *F. oxysporum* y dos tiempos después de la infección (dpi). A. Cepa F05 a los 11 dpi; A'. Cepa F05 a los 22 dpi; B. Cepa F07 a los 11 dpi; B'. Cepa F07 a los 22; C. Cepas F05 y F07 a los 11 dpi; C'. Cepas F05 y F07 a los 22 dpi.



**Tabla 1. Matrices de confusión obtenidas a partir del análisis de discriminantes lineales de datos espectrales de tomate de mesa infectadas con dos cepas de *F. oxysporum*.**

Pronóstico	Día 11		Día 22	
	CON	F05	CON	F05
CON	7	0	13	0
F05	0	10	0	11
	CON	F07	CON	F07
	CON	5	5	12
F07	2	5	1	9
	F05	F07	F05	F07
	F05 y	10	0	11
F07	0	10	0	13

## DISCUSIÓN

No se observaron los síntomas típicos del marchitamiento por *F. oxysporum* en el tiempo del ensayo, como epinastia, marchitez no uniforme de hojas o ramas y decoloración vascular extendida por encima de la línea del suelo. Aunque las raíces no fueron observadas en el transcurso del experimento, el muestreo destructivo permitió confirmar la presencia de ambas cepas (F05 y F07) en los periodos de tiempo evaluados (11 y 22 d después de inoculación) mediante identificación morfológica clásica. Se encontró mayor incidencia de la cepa F05 en las plantas de tomate en comparación con la cepa F07, ya que fueron las plantas con mayor incidencia en ambos muestreos destructivos, lo cual fue confirmado en los análisis PCA y LDA realizados con los datos espectrales. Se puede considerar que la cepa F05 tiene una alta capacidad para infectar las plantas de tomate, sin embargo, debido a la resistencia de las variedades de tomate (Jones y Crill, 1974; Rivard y Louws, 2011; Morid *et al.*, 2012), se imposibilita la aparición de los síntomas.

Las hojas enfermas producen cambios fisiológicos significativos antes de la colonización de las hifas de *F. oxysporum*, por lo que es posible la clasificación de una planta como “enferma” con criterios basados en fluorescencia y/o espectroscopia una o dos semanas antes de que aparezcan los síntomas evidentes. Es importante destacar la concordancia de nuestros resultados con los obtenidos en el estudio de Lorenzini *et al.* (1997), en el cual encontraron que los parámetros de fluorescencia de la clorofila de las primeras hojas asintomáticas fueron alterados por la infección

de *F. oxysporum* hasta el día 14 después de la infección, debido posiblemente a una disminución de la fluorescencia variable y confirmado por la actividad alterada del fotosistema II. También es importante destacar las diferencias obtenidas entre las dos cepas de *F. oxysporum* usadas para infectar las plantas de tomate, debido a que la cascada de eventos que ocurren en las células inoculadas con microconidias de aislados con diferente nivel de patogenicidad cambia la relación específica planta-patógeno; desafortunadamente, los mecanismos implicados son complejos y aún no están claramente definidos (Olivain *et al.*, 2003).

Los resultados encontrados en los espectros de reflectancia concuerdan con los muestreos destructivos. Además, se observó una dinámica característica de los espectros de reflectancia medidos en el rango espectral para los días 11 y 22 dpi en las cepas estudiadas, F05 y F07. Esta dinámica se puede observar claramente cuando se comparan las mayores incidencias obtenidas de los muestreos destructivos en las plantas infectadas con los análisis de los datos espectrales (PCA y LDA) de la cepa F05, en los cuales las plantas se agrupan claramente y puede discriminarse de las plantas sin enfermedad y las infectadas en los dos días de medición. Por el contrario, la enfermedad tiene una baja incidencia en las plantas infectadas con la cepa F07 (particularmente en el día 11) y en los análisis de los espectros de reflectancia solo es posible agrupar y discriminar los individuos infectados al día 22, cuando la incidencia sube al 64,3%.

Las alteraciones fisiológicas o bioquímicas entre las plantas infectadas y sanas pueden ser causadas por la composición química del parásito o una respuesta desde la planta hospedera, implicando cambios en la ubicación de nutrientes y energía, hasta producción de metabolitos secundarios (Ramachandra y Ravishankar, 2002), además de posibles respuestas causadas por estrés en las plantas sugerido por cambios en segmentos del infrarrojo cercano (Ferri *et al.*, 2004; Gitelson *et al.*, 2005; Ustina *et al.*, 2009). En ese sentido, los resultados de este estudio son contrarios a los obtenidos por (Spinelli *et al.*, 2006), los cuales usaron técnicas basadas en espectroscopia de reflectancia en el NIR para detectar el “fuego bacteriano” en plantas de peral asintomáticas, sin lograr discriminar las plantas infectadas de plantas sanas. Los autores discuten que sus resultados posiblemente fueron debido a la pequeña escala de medición en la hoja (2 mm<sup>2</sup>), lo cual pudo ser contrarrestado en nuestro estudio ya que se tomaron cinco mediciones por hoja en las

cuales cada espectro medido es el resultado promedio de 100 mediciones.

Adicionalmente, es importante destacar que las respuestas fisiológicas e histológicas en plantas hospederas asintomáticas y en etapas tempranas de la infección fúngica que están relacionadas con cambios en las propiedades ópticas de las hojas en las plantas aún son desconocidas en su mayor parte. Además, la mayoría de estudios enfocados a predecir la química foliar son basados en análisis de tejido seco, lo que imposibilita el muestreo de la misma hoja en el tiempo (Fourty *et al.*, 1996; Couture *et al.*, 2013), lo cual ofrece grandes ventajas para la caracterización de respuestas de las plantas a patógenos usando muestras frescas y/o muestreo *in situ* como lo abordaron en Franke y Menz, (2007), Naidua *et al.* (2008), Mahlein *et al.* (2012), en los cuales se usaron técnicas de tele-detección en cultivos de trigo para detectar infección con oídio y roya de la hoja en diferentes periodos de tiempo del cultivo. Estos resultados concuerdan con la base teórica propuesta por Zhang *et al.* (2003), en la cual se sugiere que la magnitud de onda variará típicamente en diferentes longitudes, aumentando la reflectancia en el VIS y disminuyendo en el NIR (750-1100 nm) en las plantas infectadas con patógenos y sometidos a diferentes tipos de estrés.

## CONCLUSIONES

Se probó un método para detectar y discriminar la respuesta espectral debida a cambios en la fisiología de las plantas de tomate asintomáticas infectadas con dos cepas de *F. oxysporum* usando espectroscopía de reflectancia. Los resultados sugieren que las plantas de tomate pueden mantener niveles relativamente altos de infección sin mostrar síntomas visibles y que es posible detectar y discriminar infecciones asintomáticas de *F. oxysporum* en plantas usando espectroscopía de reflectancia con radiación en el VIS/NIR. Las cepas de *F. oxysporum* usadas en este estudio causaron diferencias claras en los espectros de reflectancia en las plantas infectadas y las no infectadas, además de permitir una buena discriminación entre las plantas infectadas con ambas cepas.

Los resultados obtenidos indican que la espectroscopía VIS/NIR es promisoría para la detección de hongos vasculares, incluso en plantas asintomáticas. Adicionalmente, la aplicación de técnicas multivariadas como PCA y LDA a datos espectrales en el VIS/NIR de muestras frescas inoculadas con diferentes

cepas de *F. oxysporum* ha mostrado ser un método eficiente para la detección y discriminación de infecciones fúngicas.

Aunque son varias las técnicas espectroscópicas y de imágenes que se han usado para la detección de enfermedades en plantas sintomáticas, es muy baja la cantidad de estudios especializados en la detección de enfermedades en plantas asintomáticas usando técnicas no destructivas como la espectroscopía de reflectancia. En este sentido, los resultados de este estudio son valiosos como contribución en esta área del conocimiento. Adicionalmente, la correspondencia entre la medición de la incidencia de la enfermedad y los cambios encontrados por la técnica de espectroscopía de reflectancia en plantas asintomáticas sugiere que es un método sensible y confiable que puede ser adecuado para el diagnóstico temprano de enfermedades en plantas. Sin embargo, los mecanismos fisiológicos y anatómicos que influyen en la expresión de síntomas de la planta debido a las infecciones fúngicas aun parecen muy complejos y no están claramente definidos, particularmente aquellos mecanismos presentes en etapas tempranas de la infección, lo cual invita a desarrollar nuevos proyectos de investigación que profundicen y aclaren esta área del conocimiento de gran importancia en enfermedades tanto vasculares como sistémicas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a todo el personal del Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Adicionalmente, agradecemos al Dr. Lucio Flavio de Alencar Figueiredo del Departamento de Botánica de la Universidad de Brasilia por sus valiosos comentarios.

**Conflicto de intereses:** el manuscrito fue preparado y revisado con la participación de los autores, quienes declaran no tener algún conflicto de interés que coloquen en riesgo la validez de los resultados aquí presentados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Khalaf, N. y M. Salman. 2014. Visible/Near infrared (VIS/NIR) spectroscopy and multivariate data analysis (MVDA) for identification and quantification of olive leaf spot (OLS) disease. *Palest. Tech. Univ. Res. J.* 2(1), 1-8.

- Baayen, R., P.K. O'Donnell, P.J. Bonants, E. Cigelnik, L. Kroon, E.J. Roebroek y C. Waalwijk. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology* 90, 891-900. Doi: 10.1094/PHYTO.2000.90.8.891
- Chaerle, L. y D. Van der Straeten. 2000. Imaging techniques and the early detection of plant stress. *Trends Plant Sci.* 5, 495-501. Doi: 10.1016/S1360-1385(00)01781-7
- Couture, J.J., S.P. Serbin y P. Townsend. 2013. Spectroscopic sensitivity of real-time, rapidly induced phytochemical change in response to damage. *New Phytol.* 198(1), 311-9. Doi: 10.1111/nph.12159
- Feller, C., H. Bleiholder, L. Buhr, H. Hack, M. Hess, R. Klose, U. Meier, R. Stauss, T. van den Boom y E. Weber. 1995. Phänologische Entwicklungsstadien von Gemüsepflanzen: Fruchtgemüse und Hülsenfrüchte. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 356, 217-232.
- Ferri, C., R. Formaggio y M. Schiavinato. 2004. Narrow band spectral indexes for chlorophyll determination in soybean canopies [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Braz. J. Plant Physiol.* 16(3), 131-136. Doi: 10.1590/S1677-04202004000300002
- Fourty, T., F. Baret, S. Jacquemoud, G. Schmuck y J. Verdebout. 1996. Leaf optical properties with explicit description of its biochemical composition: direct and inverse problems. *Remote Sens. Environ.* 56, 104-117. Doi: 10.1016/0034-4257(95)00234-0
- Franke, J. y G. Menz. 2007. Multi-temporal wheat disease detection by multi-spectral remote sensing. *Precision Agric.* 8(3), 161-172. Doi: 10.1007/s11119-007-9036-y
- Garcés, E., A. Orozco y A.C. Zapata. 1999. Fitopatología en flores. *Acta Biol Colomb.* 4(2), 5-26.
- Garcés, E., G.R. Bautista y H. Valencia. 2001. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta Biol. Colomb.* 6(1), 7-25.
- Gitelson, A., A. Viña, V. Ciganda, D. Rundquist y T.J. Arkebauer. 2005. Remote estimation of canopy chlorophyll content in crops. *Geophys. Res. Lett.* 32. Doi: 10.1029/2005GL022688
- Isaksson, T. y T. Naes. 1988. The effect of multiplicative scatter correction (MSC) and linearity improvement in NIR spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 42(7), 1273-1284. Doi: 10.1366/0003702884429869
- Jones, J. y P. Crill. 1974. Susceptibility of "resistant" tomato cultivars to fusarium wilt. *Phytopathology* 64, 1507-1510. Doi: 10.1094/Phyto-64-1507
- Kolander, T., M.J.C. Bienapfl, J.E. Kurle y D.K. Malvick. 2012. Symptomatic and asymptomatic host range of *Fusarium virguliforme*, the causal agent of soybean sudden death syndrome. *Plant Dis.* 96(8), 1148-1153. Doi: 10.1094/PDIS-08-11-0685-RE
- Lafontaine, P. y N. Benhamou. 2010. Chitosan treatment: an emerging strategy for enhancing resistance of greenhouse tomato plants to infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. radicles-lycopersici. *Biocontrol Sci. Technol.* 6(1), 111-124. Doi: 10.1080/09583159650039575
- Leslie, J.F. y B.A. Summerell. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing, Ames, IA, USA. Doi: 10.1002/9780470278376
- Lorenzini, G., L. Guidi, C. Nali, C. Ciompi y G.F. Soldatini. 1997. Photosynthetic response of tomato plants to vascular wilt diseases. *Plant Sci.* 124(2), 143-152. Doi: 10.1016/S0168-9452(97)04600-1
- Mahlein, A.K., U. Steiner, C. Hillnhütter, H. Dehne y E.C. Oerke. 2012. Hyperspectral imaging for small-scale analysis of symptoms caused by different sugar beet diseases. *Plant Methods* 8(3), PMC3274483. Doi: 10.1186/1746-4811-8-3
- Morid, B., S. Hajmansoor y N. Kakvan. 2012. Screening of resistance genes to fusarium root rot and fusarium wilt diseases in tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars using RAPD and CAPs markers. *Eur. J. Exp. Biol.* 2(4), 931-939.
- Naidua, R.A., E.M. Perryb, F.J. Pierceb y T. Mekuriaa. 2008. The potential of spectral reflectance technique for the detection of grapevine leafroll-associated virus-3 in two red-berried wine grape cultivars. *Comput. Electron. Agr.* 66, 38-45. Doi: 10.1016/j.compag.2008.11.007
- Olivain, C., S. Trouvelot, M.N. Binet, C. Cordier, A. Pugin y C. Alabouvette. 2003. Colonization of flax roots and early physiological responses of flax cells inoculated with pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(9), 5453-5462. Doi: 10.1128/AEM.69.9.5453-5462.2003
- Ortiz, E. y L. Hoyos-Carvajal. 2016. Standard methods for inoculations of *F. oxysporum* and *F. solani* in Passiflora. *Afr. J. Agric. Res.* 11(17), 1569-1575. Doi: 10.5897/AJAR2015.10448
- Ramachandra, R. y G.R. Ravishankarb. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 20, 101-153. Doi: 10.1016/S0734-9750(02)00007-1
- Rivard, C. y F. Louws. 2011. Tomato grafting for disease resistance and increased productivity. *Agricultural Innovations. Sustainable Agriculture Research and Education (SARE) program. Fact Sheets 12AGI2011*. En: <http://www.sare.org/factsheet/12AGI2011> consulta: febrero de 2018.
- Sankaran, S., A. Mishra, J. Mari y R. Ehsani. 2011. Visible-near infrared spectroscopy for detection of Huanglongbing in citrus orchards. *Comput. Electron. Agr.* 77, 127-134. Doi: 10.1016/j.compag.2011.03.004
- Spinelli, F., M. Noferini y G. Costa. 2006. Near infrared spectroscopy (NIRs): Perspective of fire blight detection in

- asymptomatic plant material. *Acta Hort.* 704, 87-90. Doi: 10.17660/ActaHortic.2006.704.9
- Szuvandzsiev, P., L. Helyes, A. Lugasi, C. Szántó, P. Baranowski y Z. Pék. 2014. Estimation of antioxidant components of tomato using VIS-NIR reflectance data by handheld portable spectrometer. *Int. Agroph.* 28(4), 521-527. Doi: 10.2478/intag-2014-0042
- Ustina, S.L., A.A. Gitelsonb, S. Jacquemoudc, M. Schaepmand, G. Asnere, J.A. Gamonf y P. Zarco-Tejadag. 2009. Retrieval of foliar information about plant pigment systems from high resolution spectroscopy. *Remote Sens. Environ.* 113(1), 67-77. Doi: 10.1016/j.rse.2008.10.019
- Zhang, M., Z. Qin, X. Liu y S.L. Ustin. 2003. Detection of stress in tomatoes induced by late blight disease in California, USA, using hyperspectral remote sensing. *Int. J. Appl. Earth Observ. Geoinf.* 4, 295-310. Doi: 10.1016/S0303-2434(03)00008-4

# Água tratada magneticamente para irrigação: efeitos na produção e eficiência do uso da água na cultura da cenoura (*Daucus carota* L.)

Magnetically treated water for irrigation: effects on production and efficiency of water use in carrot (*Daucus carota* L.) crop



FERNANDO FERRARI PUTTI<sup>1, 3</sup>  
LUÍS ROBERTO ALMEIDA GABRIEL FILHO<sup>1</sup>  
CAMILA PIRES CREMASCO<sup>1</sup>  
JOSUÉ FERREIRA SILVA JUNIOR<sup>2</sup>

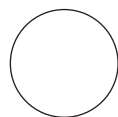
**Cenouras no momento de sua colheita.**

Foto: F.F. Putti

## RESUMO

A cultura da cenoura vem aumentando sua representatividade na produção de hortaliças devido a seus benefícios para a saúde humana. Objetivou-se neste trabalho analisar a consequência de diferentes lâminas de irrigação utilizando água tratada magneticamente e potável para a cultura da cenoura. O experimento foi conduzido na Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA-UNESP), Campus de Botucatu-SP (Brasil), entre os meses de setembro a dezembro de 2015. Adotou-se o delineamento experimental em blocos casualizados, em esquema fatorial de 2x5 com 10 repetições. Assim, os tratamentos foram 2 tipos de água (água tratada magneticamente e potável), e 5 lâminas de reposição que corresponderam aos percentuais da evapotranspiração (25, 50, 75, 100 e 125% da Etc), utilizando a irrigação por gotejamento. Constatou-se que a irrigação com água tratada magneticamente proporcionou um incremento na massa de matéria fresca, sendo que a lâmina que obteve a maior produção foi a de 100 e 125% da Etc, assim verificando a possibilidade do aumento da produtividade da cenoura. Se constatou aumento significativo para a o número de folhas, comprimento de bulbo e diâmetro para a cultura da cenoura quando irrigada com água tratada magneticamente.

**Palavras-chave adicionais:** irrigação por gotejamento, magnetismo, tubérculos, gestão da água, produtividade, qualidade da colheita.



<sup>1</sup> Faculdade de Ciências e Engenharia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Tupã-SP (Brasil). ORCID Putti, F.F.: 0000-0002-0555-9271; ORCID Filho, L.R.A.G.: 0000-0002-7269-2806; ORCID Cremasco, C.P.: 0000-0003-2465-1361

<sup>2</sup> Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu-SP (Brasil). ORCID Silva Junior, J.F.: 0000-0002-8057-1465

<sup>3</sup> Autor para correspondência. [fernandoputti@tupa.unesp.br](mailto:fernandoputti@tupa.unesp.br)





## ABSTRACT

Carrot cultivation has increased within vegetable production because of its benefits to human health. The aim of this study was to investigate the effect of different irrigation using magnetically treated water and potable water on a carrot crop. The experiment was conducted in the Department of Rural Engineering of the Faculty of Agricultural Sciences (FCA-UNESP), Botucatu-SP Campus (Brazil), from September to December, 2015. A randomized complete block with a 2×5 factorial and 10 repetitions was adopted. Thus, the treatments included 2 types of water (potable and magnetically treated) and 5 spare blades that corresponded to the percentage of evapotranspiration (25, 50, 75, 100 and 125% ETc), with drip irrigation. The magnetically treated water irrigation yielded an increase in green root biomass, and the highest production was seen with 100 and 125% ETc, verifying the possibility of increased carrot productivity. There was a significant increase in the number of leaves, bulb length and diameter when the carrot crop was irrigated with magnetically treated water.

**Additional key words:** drip irrigation, magnetism, root vegetables, water management, productivity, harvest quality.

Data de recepção: 30-11-2017    Aprovado para publicação: 30-05-2018

## INTRODUÇÃO

A cultura da cenoura vem se destacando em sua produção devido, principalmente, aos benefícios para a saúde humana. Atualmente está entre as dez hortaliças mais consumidas no Brasil, apresentando grande importância na questão do desenvolvimento socioeconômico do país (Silva *et al.*, 2011, Lima Junior *et al.*, 2014).

O cultivo de cenoura demanda um manejo de irrigação eficaz, pois devido a cultura ser sensível as condições de déficit ou excesso de água, levando a uma redução significativa na produção e produto de qualidade inferior. Caso o manejo não seja realizado de forma correta, pode ocorrer degradação da qualidade da água devido a contaminação dos recursos por defensivos agrícolas e fertilizantes. Assim, deve ser realizado de forma adequada o manejo das lavouras, objetivando maior eficiência no uso da água e nos sistemas de irrigação.

Estudos vem sendo desenvolvidos nos últimos anos com a irrigação utilizando água tratada magneticamente (ATM) na irrigação de culturas. Porém, existem poucos estudos que explicam as modificações químicas e físicas da água quando submetida ao campo magnético e o impacto dessas modificações nas culturas. Ressalta-se que de forma geral as pesquisas vêm demonstrando que a irrigação com ATM provoca o aumento na produção e qualidade das culturas (Putti *et al.*, 2015).

As culturas do grão de bico e ervilha apresentaram aumento de produção e no maior desenvolvimento ao serem irrigadas com ATM comparadas com o controle (Grewal e Maheshwari, 2011). Maheshwari e Grewal (2009) submeteram a cultura do tomate em diferentes doses de salinidade e irrigando com ATM e água potável (AP) e, foi possível verificar o aumento nos componentes de produção, assim como a qualidade do tomate, também puderam aferir que o tratamento controle (sem salinidade e irrigado com AP) produziu menos que os tratamentos com salinidade e irrigados com ATM.

De acordo com Mohamed (2013) o tomateiro quando cultivado sobre diferentes níveis de condutividade elétrica e irrigado com ATM e AP, e constatou o incremento superior quando submetidas a irrigação com água tratada magneticamente, em todas as doses de salinidade.

Assim, pode-se observar a necessidade de estudos que comprovem o efeito da irrigação com ATM, a fim de desmistificar o efeito positivo que pode provocar nas culturas. Até o momento não foram realizados estudos que comprovem o efeito na cultura da cenoura e também o estabelecimento da lâmina ideal para o melhor manejo da cultura. Deste modo a necessidade de pesquisas que estabeleçam condições ideais de manejo para a cultura da cenoura e também otimizem as formas de reduzir o volume de água aplicado via

irrigação, devido à crise hídrica vivenciada nos últimos anos. Desta forma o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de diferentes lâminas de irrigação utilizando água tratada magneticamente e potável para a cultura da cenoura.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Conduziu-se o experimento com cenoura var. Nativa em uma casa de vegetação durante os meses de setembro a dezembro de 2015. O local do experimento foi no Departamento de Engenharia Rural da UNESP, Faculdade Ciências Agrônômicas, Fazenda Experimental Lageado, localizada no município de Botucatu-SP, Brasil. A região do estudo detém o clima do tipo Cfa (Clima Subtropical Úmido), segundo a classificação de Köppen (Köppen e Geiger, 1928).

O solo era do tipo Nitossolo Vermelho Distrófico Latossólico de acordo com a classificação de Carvalho *et al.* (2000). Apresentava estrutura moderada média/argilosa, com as seguintes características químicas: pH (CaCl<sub>2</sub>)=5,9; MO=24 g dm<sup>-3</sup>; P (resina)=191 mg dm<sup>-3</sup>; K=4,8 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Ca=68 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg=25 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; H+Al=17 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; SB= 67 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; B=0,51 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Cu=4,8 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Fe=20 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mn=10,10 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Zn=8 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; CTC=114 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; V= 85%.

O solo foi preparado um mês antes do plantio, utilizando-se um trator do tipo "Tobata", em que revolveu os 30 cm da camada superficial, após foi corrigido o solo e realizadas as adubações necessárias, levantando-se os canteiros com enxada. O controle de plantas daninhas foi realizado manualmente quando necessário.

Semeou-se diretamente no solo, em que foi realizado um sulco de aproximadamente 1 cm de profundidade e utilizou-se o espaçamento de 0,05×0,05 m. As parcelas mediam 1,2 m de largura por 3 m de comprimento, totalizando 3,6 m<sup>2</sup>. Realizou-se o plantio de 4 linhas, sendo desconsidera as linhas laterais e avaliou apenas as plantas centrais. As adubações foi realizada de acordo com as recomendações da cultura para a região.

O delineamento experimental adotado foi em blocos ao acaso, com dez tratamentos e dez repetições. Os tratamentos foram constituídos das lâminas de irrigação correspondente a 25, 50, 75, 100 e 125% da

evaporação de água do tanque Classe "A" e dos tipos de água sendo potável e tratada magneticamente. Os dados climáticos do experimento foram coletados ao longo do experimento, no horário das 8 h da manhã, em que se havia instalado dentro da casa de vegetação um tanque Classe "A" e uma estação meteorológica.

Utilizou-se o equipamento da Sylocymol (Timol Group, Uberlândia-MG, Brasil), que detinha capacidade de magnetizar 5 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> por hora. O sistema de irrigação foi instalado de forma independente. As fitas gotejadora possuíam espaçamento de 0,30 m entre gotejadores, sendo sua vazão média de 1,472 L h<sup>-1</sup>, quando submetida a uma pressão de 10 m.c.a.

Na determinação do tempo de irrigação utilizou o método proposto por Marouelli *et al.* (2002) utilizando o Tanque Classe A. E para o cálculo do K<sub>p</sub> aplicou-se os métodos proposto por Snyder (1992) e o K<sub>c</sub> utilizado foi o recomenda 0,80; 1,00; 95,00, sendo no início, metade e final do ciclo, respectivamente, de acordo com a Allen *et al.* (1998).

Para a determinação dos efeitos das diferentes lâminas de irrigação e dos tipos de água, foram coletadas no momento da colheita 10 plantas por parcela e avaliou-se o comprimento de bulbo (CB), diâmetro de bulbo (DB), massa fresca do bulbo (MFB), massa seca do bulbo (MSB), números de folhas (NF), massa fresca das folhas (MFF), massa seca das folhas (MSF) e a eficiência do uso da água (produção/lâmina aplicada).

Na análise estatística aplicou a análise de variância (teste F), a 1 e 5% de probabilidade (Banzatto e Kronka, 2006), com uso do software SigmaStat e Minitab.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados climáticos foram determinados através de uma estação meteorológica. Na tabela 1 pode-se observar os valores da temperatura e umidade média máxima e mínima durante o período de condução do experimento.

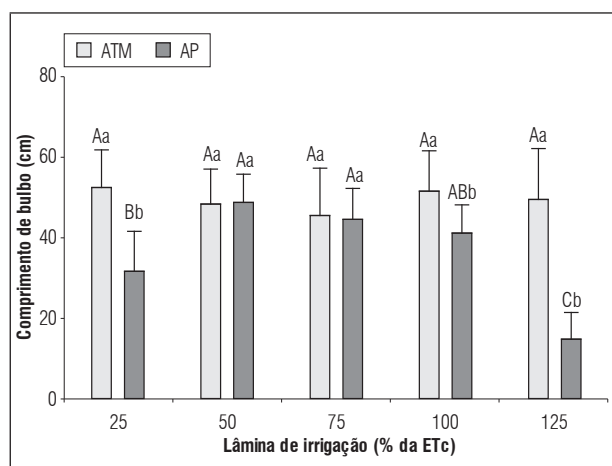
A temperatura média observada ao longo do experimento foi de 23,65°C. Sabe-se que temperatura acima de 21°C favorecem o crescimento curto de raízes e de coloração diferente (Lima Junior *et al.*, 2012). Também foi constatado que ao longo do experimento foi evaporado um total de 188,76 mm. Na avaliação do sistema de irrigação foi constatado o coeficiente de uniformidade de distribuição (CUD) de 95%.

**Tabela 1. Dados climáticos de temperatura, umidade máxima, média e mínima e evaporação coletados durante a execução do experimento conduzido no Departamento de Engenharia Rural, FCA-UNESP.**

Parâmetros	Ciclo do experimento	
	Temperatura (°C)	Mínima
	Máxima	32,30 ± 5,01
	Média	23,65 ± 3,25
Umidade relativa (%)	Mínima	25,00 ± 14,8
	Máxima	78,00 ± 11,0
	Média	52,50 ± 11,9
Evaporação (mm)	188,76	

± indica desvio padrão.

Para a variável comprimento do bulbo não houve efeito significativo quando aplicado a diferentes lâminas de irrigação com ATM. E quando irrigado com água potável, ocorreu um incremento em função das lâminas de irrigação (Fig. 1).



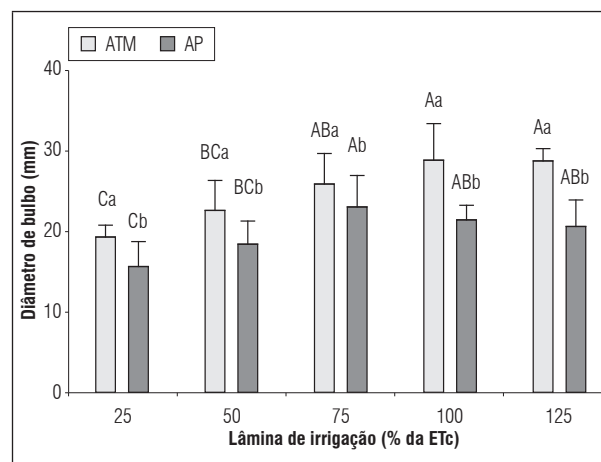
**Figura 1. Comprimento do bulbo da cenoura submetida a diferentes lâminas de irrigação e tipos de água. As médias seguidas de mesma letra, minúscula comparando o tipo de água e maiúscula comparando as lâminas de irrigação, não apresentam diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey. As barras de erro indicam o desvio padrão da média de 10 repetições ( $n=10$ ). ATM: água tratada magneticamente; AP: água potável.**

A irrigação com AP provocou o menor incremento com a lâmina de reposição de 125% da ETc, devido ao efeito do excesso de água e o maior CB ocorreu quando irrigada com as lâminas de 50 e 75% da ETc,

assim acarretando no aumento de 50%. Em função do tipo de água adotado na irrigação, observou que as lâminas de 25, 100 e 125 % da ETc obtiveram um aumento quando submetida a irrigação com ATM, apresentando o efeito positivo no comprimento de bulbo da cenoura.

Não verificou reduções no comprimento de bulbo devido a disponibilidade de água no solo. Lima Junior *et al.* (2012) constatou que quando a tensão de água no solo foi de -15 kPa ocorreu a máxima produção e ocorreu o efeito significativo das lâminas de irrigação. A irrigação com ATM apresentou efeito significativo no comprimento de raiz do tomate (Selim e El-Nady, 2011). Também foi constatado por Putti *et al.* (2013) que ocorreu o aumento do comprimento do sistema radicular para a cultura da alface quando submetida a irrigação com ATM. Tal aumento possivelmente oriundo do comportamento da água quando submetida ao campo magnético, em que facilita a absorção e isso provoca o aumento na absorção de nutrientes e consequentemente o comprimento do bulbo (Putti *et al.*, 2015).

O diâmetro de bulbo quando irrigado com diferentes lâminas de irrigação e tipos águas, apresentou efeito significativo, assim provocando um aumento devido a variação da taxa de aplicação (Fig. 2).



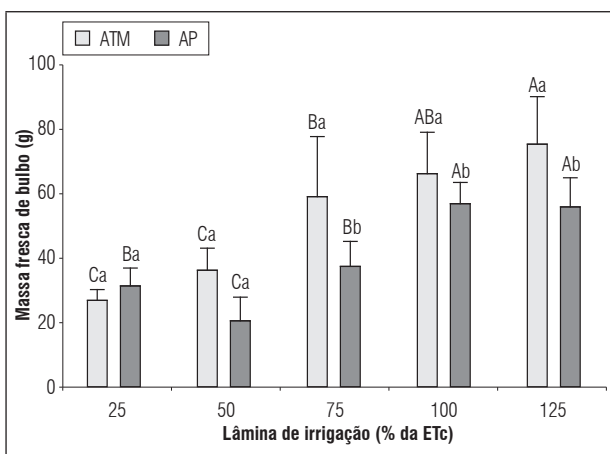
**Figura 2. Diâmetro de bulbo da cenoura submetida a diferentes lâminas de irrigação e tipos de água. As médias seguidas de mesma letra, minúscula comparando o tipo de água e maiúscula comparando as lâminas de irrigação, não apresentam diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey. As barras de erro indicam o desvio padrão da média de 10 repetições ( $n=10$ ). ATM: água tratada magneticamente; AP: água potável.**

A irrigação com ATM, ocasionou um aumento até a lâmina de 100% da ETo ( $P \leq 0,05$ ). E para lâmina de 25% da ETo ocorreu o menor diâmetro de bulbo, sendo que a redução foi de 66%.

Verificou-se que a irrigação com água tratada magneticamente proporcionou aumento significativo para todas as lâminas de irrigação.

Shibairo *et al.* (2000) e Souza *et al.* (2011) observaram que o déficit hídrico proporciona redução linear para o DB, em que devido ao estresse provocado, ocasiona turgescência na planta e leva a redução do processo fotossintético e assim reduzindo a produção de energia e açúcares e leva a redução da produtividade.

A massa fresca do bulbo apresentou efeito significativo quando irrigado com ATM e também quando comparada com AP (Fig. 3).



**Figura 3.** Massa fresca do bulbo da cenoura submetida a diferentes lâminas de irrigação e tipos de água. As médias seguidas de mesma letra, minúscula comparando o tipo de água e maiúscula comparando as lâminas de irrigação, não apresentam diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey. As barras de erro indicam o desvio padrão da média de 10 repetições ( $n=10$ ). ATM: água tratada magneticamente; AP: água potável.

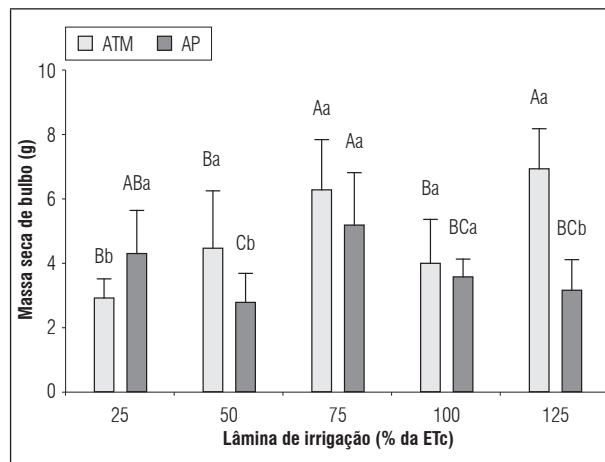
Para a MFB, pode-se verificar que para as lâminas de 25 e 50% da ETC não houve diferença quanto a aplicação do tipo de água. Para as demais constatou-se que ocorreu maior peso, diferindo significativamente ( $P \leq 0,05$ ). Deve-se ressaltar que o potencial para a redução da aplicação de água magnética frente a sem o tratamento. Pois verificou-se que houve a FVB

quando irrigada com 75% da ETC obteve resultado similar ao 100% da ETC com água sem o tratamento.

De acordo com estudo de Lima Junior *et al.* (2012), houve efeito linear negativo em função do aumento da disponibilidade hídrica, pois prejudicando seu desenvolvimento quando irrigado com a lâmina acima da recomendada. Também foi constatado por Putti *et al.* (2015) que a produtividade da alface apresentou um aumento significativo, sendo que a maior disponibilidade de água no solo, provavelmente favoreceu o aumento da absorção de nutrientes. Também constatado por Aladjadjiyan e Ylieva (2003) que a irrigação utilizando ATM favoreceu a produção de tabaco como também a qualidade.

Estudo envolvendo a ATM, constataram aumento na produção e, deve-se ressaltar que além das características de produção, também verificou o aumento nos teores de macro e micronutrientes nas cultivares, assim demonstrando-se um potencial de biofortificação de elementos necessários para a saúde humana (Aladjadjiyan e Ylieva, 2003; Maheshwari e Grewal, 2009; Selim *et al.*, 2011; Rawabdeh *et al.*, 2014; Sayed e Sayed, 2014; UI Haq *et al.*, 2016).

A massa seca do bulbo apresentou interação entre os fatores, conforme podemos verificar na figura 4.

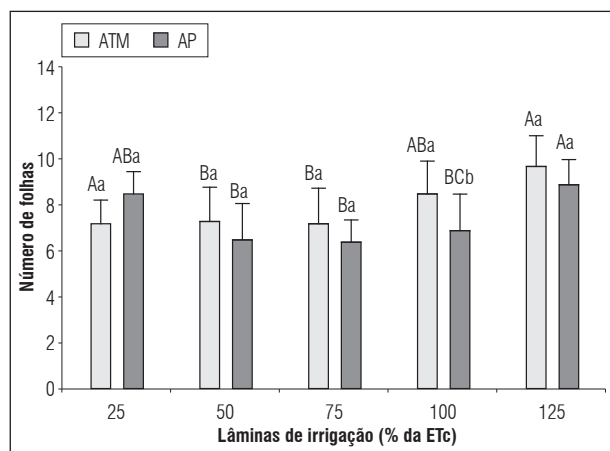


**Figura 4.** Massa seca do bulbo da cenoura submetida a diferentes lâminas de irrigação e tipos de água. As médias seguidas de mesma letra, minúscula comparando o tipo de água e maiúscula comparando as lâminas de irrigação, não apresentam diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey. As barras de erro indicam o desvio padrão da média de 10 repetições ( $n=10$ ). ATM: água tratada magneticamente; AP: água potável.

Pode-se observar que o efeito do tratamento magnético da água, apresentou para as lâminas de 50 e 125% da ETC maior incremento de MSB, diferindo significativamente. Também constata-se que ocorreu o efeito das lâminas de irrigação em que o déficit hídrico e o excesso de água provocaram efeitos de redução de MSB.

O campo magnético quando em contato com a água provoca alterações em suas características físicas e químicas, como constatado por Lin e Yotvat (1990). Assim essas alterações levam diretamente a alterações no soluto do solo, sendo que o pH e Condutividade elétrica, fatores limitantes no desenvolvimento de plantas, sofrem redução (Grewal e Maheshwari, 2011; Khoshravesh *et al.*, 2011).

O número de folhas da cenoura apresentou interação quando submetida a diferentes taxas de reposição da lâmina de irrigação e dos tipos de água (Fig. 5).



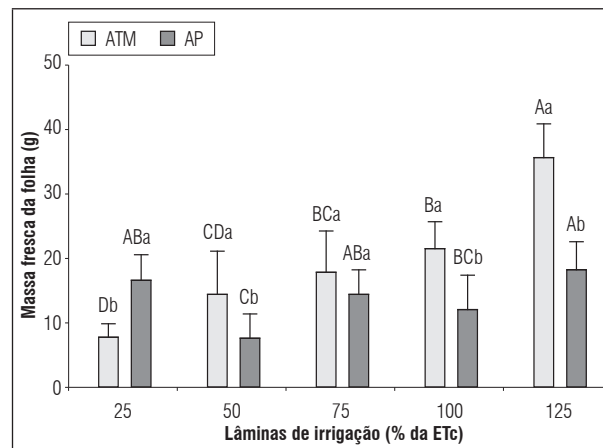
**Figura 5.** Número de folhas da cenoura submetida a diferentes lâminas de irrigação e tipos de água. As médias seguidas de mesma letra, minúscula comparando o tipo de água e maiúscula comparando as lâminas de irrigação, não apresentam diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey. As barras de erro indicam o desvio padrão da média de 10 repetições ( $n=10$ ). ATM: água tratada magneticamente; AP: água potável.

Nota-se, que a irrigação com água tratada magneticamente apresentou um maior incremento para as lâminas de 100% e 125% da ETC, assim se diferenciando estatisticamente ( $P \leq 0,05$ ).

Os tratamentos que foram irrigados com AP apresentaram maior número de folhas, para a lâmina de 125%

da ETC e os menos números com 50 e 75% da ETC. Ao comparar o efeito do tipo de água, observa-se que apenas o tratamento 100% da ETC obteve maior acúmulo quando irrigado com ATM, assim acarretando em aumento de 23%.

A massa fresca das folhas apresentou interação significativa ( $P \leq 0,05$ ) quando irrigadas com diferentes taxas de reposição e tipos de água (Fig. 6).



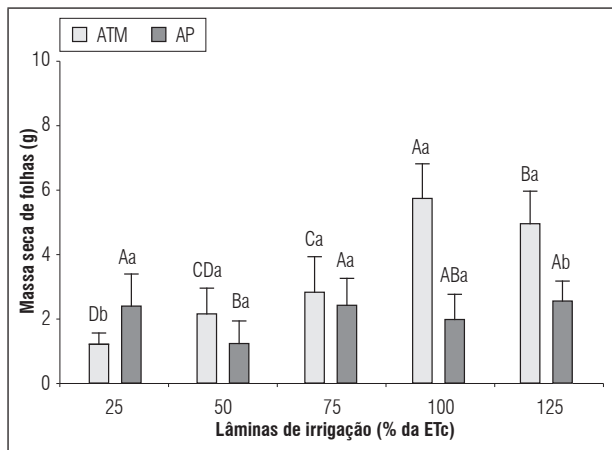
**Figura 6.** Massa fresca das folhas da cenoura submetida a diferentes lâminas de irrigação e tipos de água. As médias seguidas de mesma letra, minúscula comparando o tipo de água e maiúscula comparando as lâminas de irrigação, não apresentam diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey. As barras de erro indicam o desvio padrão da média de 10 repetições ( $n=10$ ). ATM: água tratada magneticamente; AP: água potável.

A MFF representa indiretamente a área foliar, e pode-se constatar que a relação direta com a MFB, pois isso pode ter provocado maior taxa fotossintética e assim acarretando em maior produção de cenoura. Nas lâminas de reposição utilizando AP, observa-se que ocorreu maior incremento para as lâminas de 125% da ETC e o menor para a lâmina de 50% da ETC, este fato é oriundo devido a baixas lâminas de reposição e assim acarretando no estresse hídrico.

Para a irrigação utilizando ATM, verificou-se que ocorreu a sinergia positiva em função das lâminas de irrigação, pois a disponibilidade de água no solo fez com o que as folhas apresentassem maior desenvolvimento, assim podendo ocorrer os processos fisiológicos. Pode-se constatar que a lâmina de 125% da ETC apresentou maior MFF e a menor com 25% da ETC, assim apresentando a redução de 78%.



Para massa seca das folhas constatou o efeito das lâminas de irrigação sob a influência do topo de água adotado (Fig. 7).



**Figura 7. Massa seca das folhas da cenoura submetida a diferentes lâminas de irrigação e tipos de água. As médias seguidas de mesma letra, minúscula comparando o tipo de água e maiúscula comparando as lâminas de irrigação, não apresentam diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey. As barras de erro indicam o desvio padrão da média de 10 repetições ( $n=10$ ). ATM: água tratada magneticamente; AP: água potável.**

A MSF apresentou efeito significativo quando submetido ao estresse hídrico, para ambos os tipos de água. Entretanto quando irrigado com ATM, pode-se constatar que ocorreu um incremento até a lâmina de 100% da ETc, e após a redução no acúmulo de MSF.

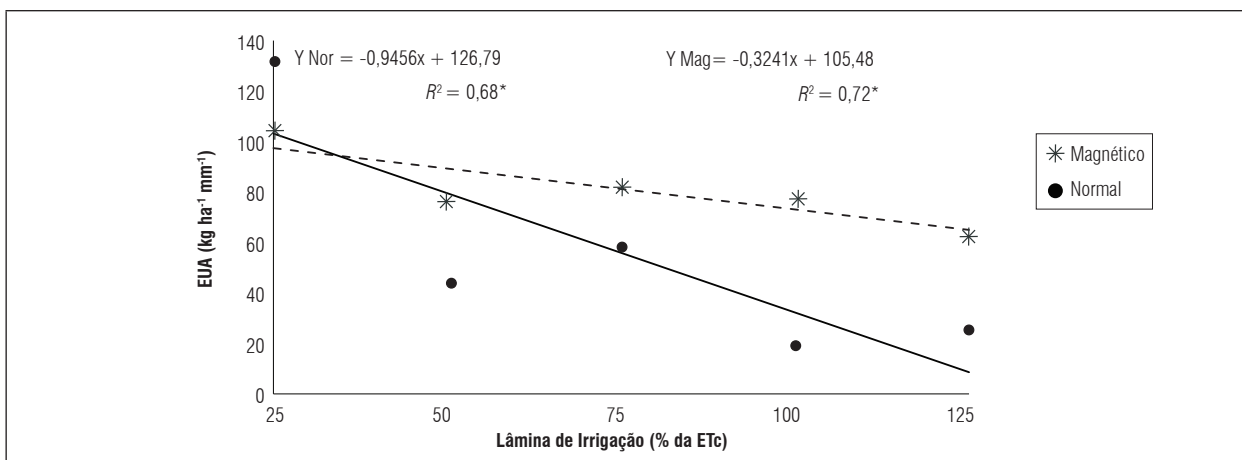
Tal fato é oriundo devido a desregulação dos processos fisiológicos essenciais para o desenvolvimento da planta, tanto pelo estresse hídrico como pelo excesso de água no solo (Taiz e Zeiger, 2013).

Para os tratamentos irrigados com 25 e 125% da ETc, verificou-se um maior número de folhas e acúmulo de MFF, esse mesmo resultando foi observado para o MSF.

Para os componentes MFF, MSF e NF foi constatado por Putti *et al.* (2015) que para a cultura da alface, ocorre maior incremento. Tal fato provavelmente é oriundo da maior disponibilidade hídrica no solo, que deste modo ocasiona maior absorção de nutrientes. Tais componentes tem relação direta com a taxa fotossintética, assim pode constar para os tratamentos irrigados com lâmina de 100 e 125% apresentaram os maiores acúmulos e ocasionou-se as maiores MFB.

Observa-se, que para os tratamentos irrigados com água tratada magneticamente, ocorreu incremento de MSF até a lâmina de 100% da ETc e devido ao excesso de água no solo ocorreu redução no acúmulo de massa seca. Ao analisar o efeito do tipo de água nos tratamentos, verificaram que para as lâminas de 100 e 125% da ETc, ocorreram maior acúmulo quando irrigadas com ATM.

Diante dos resultados obtidos para a irrigação com ATM, buscou-se mitigar a eficiência do uso da água, que consideram a da relação de produção com a lâmina de irrigação aplicada. Neste sentido pode constatar que a irrigação utilizando água magnetizada apresentou maior eficiência no uso da água, tais resultados são apresentados na (Fig. 8).



**Figura 8. Eficiência do uso de água (EUA) na cultura da cenoura submetida a irrigação com diferentes lâminas de irrigação e tipos de água.**

Pode-se constatar que o aumento de 1% da ETC faz reduzir em 0,95 kg quando irrigada com AP, já quando adotada a irrigação com ATM a redução chega a apenas 0,32 kg, deste modo apresentando a eficiência no uso da ATM. A cenoura por se tratar de uma *Apiaceae* que desenvolve sua parte comercial no solo, apresenta alta correlação com a disponibilidade de água e as condições de solo como pH, condutividade elétrica e fertilidade. Assim, a ATM quando em contato com o solo altera suas propriedades químicas e físicas, sendo que ocorre a redução do pH e aumento da condutividade (Zhou *et al.*, 2000). Silva *et al.* (2011) observaram que o acréscimo da taxa de reposição de água ocasionou um aumento na produtividade, sendo que o máximo foi encontrado com 136% da ETC. Khoshra- ves *et al.* (2011) verificaram que ocorreu o efeito da redução da força das moléculas de água, o que ocasiona redução do potencial matricial do solo, que leva a redução da tensão, favorecendo o potencial osmótico, que acarreta a redução no dispêndio de energia, levando ao maior desenvolvimento.

## CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o uso de ATM proporciona aumento no desenvolvimento da cultura da cenoura, em que ocasionou maior produção. E para lâmina de 100% da ETC com ATM proporcionou a maior produção, assim se tornando uma forma sustentável de otimizar o uso da água.

**Conflito de interesses:** o manuscrito foi preparado e revisado com a participação de todos os autores, que declaram não ter qualquer conflito de interesses que possa afetar a validade dos resultados do trabalho apresentado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aladjadjiyan, A. e T. Ylieva. 2003. Influence of stationary magnetic field on the early stages of the development of tobacco seeds. *J. Central Eur. Agric.* 4(2), 1-8. Doi: 10.5513/jcea.v4i2.167
- Allen, R.G., L.S. Pereira, D. Raes e M. Smith. 1998. Crop evapotranspiration-guidelines for computing crop water requirements. FAO Irrigation and Drainage Paper 56. FAO, Roma.
- Banzatto, D.A. e S.N. Kronka. 2006. Agricultural experimentation. Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão, Jaboticabal-SP, Brasil.
- Carvalho, R., A.E. Furtine Neto, C. Nilton e L.A. Fernandes. 2000. Dessorção de fósforo por silício em solos ácidos. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 24, 69-74. Doi: 10.1590/S0100-06832000000100009
- Grewal, H.S. e B.L. Maheshwari. 2011. Magnetic treatment of irrigation water and snow pea and chickpea seeds enhances early growth and nutrient contents of seedlings. *Bioelectromagnetics* 32(1), 58-65. Doi: 10.1002/bem.20615
- Lima Junior, J.A., G.M. Pereira, L.O. Geisenhoff, W.G. da Silva, R.C.V. Boas e R.J. Souza. 2012. Desempenho de cultivares de cenoura em função da água no solo. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.* 16(5), 514-520. Doi: 10.1590/S1415-43662012000500007
- Khoshravesh, M., B. Mostafazadeh-Fard, S.F. Mousavi e A.R. Kiani. 2011. Effects of magnetized water on the distribution pattern of soil water with respect to time in trickle irrigation. *Soil Use Manage.* 27, 515-522. Doi: 10.1111/j.1475-2743.2011.00358.x
- Köppen, W. e R. Geiger 1928. *Klimate der Erde*. Verlag Justus Perthes, Gotha, Alemanha.
- Lin, I.J. e J. Yotvat. 1990. Exposure of irrigation and drinking water to a magnetic field with controlled power and direction. *J. Mag. Mag. Mat.* 83(1), 525-526. Doi: 10.1016/0304-8853(90)90611-S
- Maheshwari, B.L. e H.S. Grewal. 2009. Magnetic treatment of irrigation water: its effects on vegetable crop yield and water productivity. *Agric. Water Manag.* 96, 1229-1236. Doi: 10.1016/j.agwat.2009.03.016
- Mohamed, A.I. 2013. Effects of magnetized low quality water on some soil properties and plant growth. *Int. J. Res. Chem. Environ.* 3(2), 140-147.
- Marouelli, W.A., W.L. Silva e C.L. Moretti. 2002. Desenvolvimento de plantas, produção e qualidade de bulbos de alho sob condições de deficiência de água no solo. *Hortic. Bras.* 20(3), 470-473. Doi: 10.1590/S0102-05362002000300014
- Putti, F.F., L.R.A. Gabriel Filho, A.E. Klar, C.P. Cremasco, R. Ludwig e J.F. Silva Junior. 2013. Desenvolvimento inicial da alface (*Lactuca sativa* L.) irrigada com água magnetizada. *Rev. Cultivando o Saber* 6(3), 83-90.
- Putti, F.F., L.R.A. Gabriel Filho, A.E. Klar, J.F. Silva Junior, C.P. Cremasco e R. Ludwig. 2015. Response of lettuce crop to magnetically treated irrigation water and different irrigation depths. *Afr. J. Agr. Res.* 10(22), 2300-2308. Doi: 10.5897/AJAR2015.9616
- Rawabdeh, H., S. Shiyab e R. Shibl. 2014. The effect of irrigation by magnetically water on chlorophyll and macroelements uptake of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Jordan J. Biol. Sci.* 10(2), 205-21.
- Sayed, H. e A. El Sayed, 2014. Impact of magnetic water irrigation for improve the growth, chemical composition and yield production of broad bean (*Vicia faba* L.) plant. *Am. J. Exp. Agric.* 4(4), 476-496. Doi: 10.9734/AJEA/2014/7468

- Selim, A.F.H. e M.F. El-Nady. 2011. Physio-anatomical responses of drought stressed tomato plants to magnetic field. *Acta Astronaut.* 69(7), 387-396. Doi: 10.1016/j.actaastro.2011.05.025
- Shibairo, S.I., M.K. Upadhyaya e P.M.A. Toivonen. 2002. Changes in water potential, osmotic potential, and tissue electrolyte leakage during mass loss in carrots stored under different conditions. *Sci. Hortic.* 95, 13-21. Doi: 10.1016/S0304-4238(02)00034-1
- Silva, V.J., R.E.F. Teodoro, C.H. Paula, A.D. Martins e J.M.Q. Luz. 2011. Response of the application of carrot different irrigation. *Biosci. J.* 27(6), 954-963.
- Snyder, R.L. 1992. Equation for evaporation pan to evapotranspiration conversions. *J. Irrig. Drain. Eng.* 118(6), 977-980. Doi: 10.1061/(ASCE)0733-9437(1992)118:6(977)
- Souza, E.R., A.A. de A. Montenegro, S.M.G. Montenegro e J.A. de Matos. 2011. Temporal stability of soil moisture in irrigated carrot crops in Northeast Brazil. *Agric. Water Manag.* 99, 26-32. Doi: 10.1016/j.agwat.2011.08.002
- Taiz, L. e E. Zeiger. 2013. *Elementi di fisiologia vegetale*. Piccin-Nuova Libreria, Pádua, Itália.
- Ul Haq, Z., M. Iqbal, Y. Jamil, H. Anwar, A. Younis, M. Arif, Z. Fareed e F. Hussain. 2016. Magnetically treated water irrigation effect on turnip seed germination, seedling growth and enzymatic activities. *Inf. Proces. Agric.* 3(2), 99-106. Doi: 10.1016/j.inpa.2016.03.004
- Zhou, K.X., G.W. Lu, Q.C. Zhou, J.H. Song, S.T. Jiang e H.R. Xia. 2000. Monte Carlo simulation of liquid water in a magnetic field. *J. Appl. Phys.* 89, 1802-1805. Doi: 10.1063/1.1305324

# Acumulación de biomasa en yuca (*Manihot esculenta* C.) ante la respuesta a la aplicación de fertilizantes NPK y biofertilizantes en condiciones de invernadero en dos tipos de suelo

Biomass accumulation response of cassava (*Manihot esculenta* C.) to NPK fertilization and biofertilizers in two soil types under greenhouse conditions

JAZMÍN VANESSA PÉREZ-PAZOS<sup>1</sup>  
LILY LORENA LUNA-CASTELLANOS<sup>1</sup>  
OSCAR BURBANO-FIGUEROA<sup>1, 2</sup>



Cultivo de yuca, establecido en casa malla.

Foto: J.V. Pérez-Pazos

## RESUMEN

El cultivo de la yuca en el Caribe colombiano es un sistema productivo con un bajo nivel de integración de tecnologías modernas sustentables que permitan incrementar la rentabilidad del cultivo. La validación de prácticas asociadas a la fertilización conforma una de las alternativas para incluir en las estrategias de manejo integrado del cultivo. El objetivo de este estudio fue evaluar a nivel de casa malla, la respuesta de acumulación de biomasa en plantas de yuca a la fertilización NPK en dos tipos de suelos (arenoso y franco-arcilloso) y en presencia de tres biofertilizantes. El efecto de diferentes inoculantes microbianos comercialmente disponibles, Azobac® (*Azotobacter chroococcum*), Fosforiz® (*Pseudomonas fluorescens*) y micorrizas arbusculares (Safer Micorrizas®), fue evaluado en mezcla con diferentes niveles de fertilización inorgánica (100, 75, 50, 25 y 0%), más los testigos sin inoculación en un arreglo factorial 2×3×5. Los resultados obtenidos indican que el nivel de fertilización NPK en el que se alcanza la mayor acumulación relativa de biomasa ocurre al 25% de la mezcla. Los mayores valores de acumulación de biomasa se alcanzan con la presencia de micorrizas. Azobac® y Fosforiz® no exhibieron ningún efecto sobre la acumulación de biomasa. Los resultados obtenidos sugieren que los biofertilizantes comerciales basados en micorrizas pueden ser usados para maximizar la respuesta a la fertilización con NPK.

<sup>1</sup> The Plant Interactions Laboratory, Centro de Investigación Turipaná, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica, ahora Agrosavia), Cereté (Colombia). ORCID Pérez-Pazos, J.: 0000-0002-1889-8248; ORCID Luna-Castellanos, L.: 0000-0003-2172-7842; ORCID Burbano-Figueroa, O.: 0000-0002-6604-7333

<sup>2</sup> Autor para correspondencia. [burbano.figueroa1@gmail.com](mailto:burbano.figueroa1@gmail.com)

**Palabras clave adicionales:** nutrición vegetal, bacterias promotoras de crecimiento, hortalizas de raíz, cultivos de almidón, región Caribe colombiana, suelo arenoso, suelo franco arcilloso.

## ABSTRACT

The adoption of sustainable technologies that are able to increase profitability in the cassava production systems of the Colombian Caribbean is very limited. The assessment of alternative fertilization practices is required for the development of integrated approaches for crop management. The objective of this research was to estimate how the biomass accumulation response of cassava plants to NPK fertilization is affected by the inoculation of three biofertilizers under greenhouse conditions in two soil types (sandy and clayey loam soils). The selected biofertilizers are commercial products available in the Colombian market: Azobac® (*Azotobacter chroococcum*), Fosforiz® (*Pseudomonas fluorescens*) and arbuscular mycorrhizal fungi (Safer Micorrizas®). NPK was applied at varying levels of the recommended nutrients requirements (100, 75, 50, 25 and 0%) in inoculated and non-inoculated (control) treatments in a 2×3×5 factorial design. The highest biomass accumulation was obtained at the lower fertilization levels (25%) in the treatment inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. The cassava plants inoculated with Azobac® and Fosforiz® did not exhibit increased biomass accumulation. Our results suggest that commercial biofertilizers based on mycorrhizal fungi can be used for maximizing cassava responses to NPK fertilization.

**Additional key words:** plant nutrition, growth promoting bacteria, root vegetables, starch crops, Colombian Caribbean region, sandy soil, clay loam soil.

Fecha de recepción: 25-01-2018 Aprobado para publicación: 30-05-2018

## INTRODUCCIÓN

La yuca es uno de los productos agrícolas de importancia para la seguridad alimentaria de la mayoría de los países en vías de desarrollo (DANE, 2004; Vila, 2012). En el 2016 a nivel mundial, se registró un área cultivada de 23,5 millones de hectáreas (FAO, 2016), de las cuales la mitad corresponde a los países en vía de desarrollo, donde la facilidad del cultivo y el gran contenido de energía de la yuca se ha convertido en un valioso producto comercial para millones de agricultores (João *et al.*, 2016). En Latinoamérica, después de Brasil y Paraguay, Colombia es el tercer productor de yuca, con un área cultivada de 210.250 ha, producción de 2,1 millones de toneladas y un rendimiento promedio de 10,01 t ha<sup>-1</sup> (FAO, 2016). En la región Caribe, se concentra el 50% de la producción nacional pero no obstante, los rendimientos son bajos, como consecuencia de la deficiente nivel de integración de tecnologías (MADR, 2006). Es un producto de economía campesina con prácticas tradicionales en su manejo, poco intensivo en el uso de maquinaria agrícola, uso de semillas de calidad, fertilización de suelos e insumos químicos para el control

de enfermedades y malezas (Aguilera, 2012), que permitan maximizar la productividad de las plantas.

Si bien es un cultivo rústico, los altos rendimientos del cultivo de yuca requieren de la aplicación de fertilizantes minerales o abonos orgánicos. Dosis óptimas de fertilización permiten alcanzar entre 40 y 60 t ha<sup>-1</sup> de raíces comerciales (Howeler, 2014). Sin embargo, el uso excesivo de fertilizantes edáficos causa graves daños al medio ambiente e incrementa los costos de producción en un cultivo de subsistencia como la yuca. Una de las alternativas promisorias para la disminución del uso de los fertilizantes de tipo mineral lo constituyen los biofertilizantes (Grageda *et al.*, 2012). Estos productos están elaborados a base de microorganismos, los cuales una vez incorporados al suelo pueden establecer relaciones generalmente de tipo benéfico con las plantas favoreciendo positivamente la nutrición, crecimiento y protección (Vessey, 2003). En el suelo existe una diversidad de microorganismos benéficos distribuidos en diferentes grupos. El primero, lo constituyen las bacterias



promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), definidas así por la capacidad de favorecer el crecimiento vegetal a través de mecanismos como la fijación de nitrógeno, solubilización de minerales, producción de fitohormonas, sideróforos y compuestos antagónicos a los fitopatógenos (Lugtenberg y Kamilova, 2009). En el segundo grupo se encuentran los hongos vesículo-arbusculares (micorrizas), especialmente las endomicorrizas, las cuales se incorporan al sistema radicular de la planta favoreciendo la nutrición a través de la absorción, regulación de minerales y agua, contribuyendo a la disminución de la erosión en el suelo (Sánchez, 1999; Sylvia *et al.*, 1999). La incorporación de micorrizas en los sistemas de cultivo incrementa la adaptación del material vegetal al entorno, generando una mayor competitividad y productividad respecto a plantas no micorrizadas (Molina *et al.*, 2005). Con el fin de generar una línea base para el desarrollo y posterior vinculación de nuevas tecnologías asociadas al componente de fertilización dentro del modelo integrado de producción de yuca, este trabajo pretende evaluar la respuesta de acumulación de biomasa en estas plantas a la fertilización NPK en dos tipos de suelos (arenoso-arcilloso) y presencia de tres biofertilizantes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo durante el segundo semestre de 2013, en el Centro de Investigación (CI) Turipaná - Corpoica (ahora Agrosavia), ubicado en el km 13 vía Cereté-Montería (Córdoba, Colombia), con coordenadas geográficas 8°31'16" N y 75°58.11" W. El experimento fue desarrollado bajo condiciones controladas en invernadero, a una temperatura promedio de 30±2°C y humedad relativa de 80±5%.

## Material vegetal

Estacas de yuca de la variedad MCol-2215 o 'Venezolana' de 20 cm de longitud con 5-6 yemas, de buen grosor y vigor, fueron obtenidas de plantas maduras de 10 meses de edad, sanas, uniformes en diámetro y provenientes del tercio medio. Las estacas fueron desinfectadas empleando una mezcla a base de fungicida e insecticida.

## Suelos

Dos tipos de suelos provenientes del Valle del Sinú (Cereté, Córdoba) y sabanas colinadas (Ciénaga de Oro, Córdoba) en la región del Caribe Colombiano fueron usados. El suelo homogeneizado se depositó en bolsas de polietileno calibre 4 de 25×45 cm, con capacidad para 4 kg, las cuales se ubicaron en estibas plásticas. Una muestra de 1 kg de suelo, compuesta de 5 sub-muestras en forma de equis fue analizada para los parámetros: textura, pH, materia orgánica, fósforo disponible y potasio intercambiable.

## Biofertilizantes y fertilización inorgánica

Se emplearon los inoculantes microbianos disponibles comercialmente Azobac®, Fosforiz® y Safer Micorrizas M.A.®, de manera individual y en mezcla con diferentes niveles de fertilización inorgánica: 100, 75, 50, 25 y 0%, además de un control con los niveles de fertilización inorgánica sin inoculación.

La fertilización inorgánica se realizó con los macronutrientes nitrógeno, fósforo y potasio (NPK) aplicados en forma de urea, fosfato diamónico (DAP) y cloruro de potasio (KCl). Las dosis de cada fertilizante se calcularon teniendo en cuenta los requerimientos del cultivo de yuca por Cadavid (2002) (Tab. 1).

**Tabla 1. Dosis de fertilizantes inorgánicos NPK estimados para cultivo de yuca en el Caribe colombiano.**

Requerimientos	Suelo Ciénaga de Oro			Suelo C.I. Turipaná		
	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O
Requerimiento elemento por cultivo (kg ha <sup>-1</sup> )	120	50	100	120	25	80
Requerimiento producto (kg ha <sup>-1</sup> )	260,9	108,7	166,7	260,9	54,3	133,3
Requerimiento producto (g/planta) Dosis 100%	26,1	10,9	16,7	26,1	5,4	13,3
Requerimiento producto (g/planta) Dosis 75%	19,6	8,2	12,6	19,6	4,1	10
Requerimiento producto (g/planta) Dosis 50%	13	5,4	8,4	13	2,7	6,6
Requerimiento producto (g/planta) Dosis 25%	6,6	2,7	4,2	6,6	1,4	3,4

**Tabla 2. Biofertilizantes incluidos en la fertilización inorgánica de yuca en el Caribe colombiano.**

Biofertilizante	Microorganismo	Registro de venta ICA	Distribuidor	Composición
Azobac®	<i>Azotobacter chroococcum</i>	6520	Fundases, Bogotá (Colombia)	14·10 <sup>8</sup> UFC/mL
Fosforiz®	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6519		14·10 <sup>8</sup> UFC/mL
Safer Micorrizas M.A.®	<i>Glomus fasciculatum</i> , <i>Scutellospora heterogama</i> , <i>Glomus mosseae</i> , <i>Glomus manihotis</i> , <i>Acaulospora rugosa</i> y <i>Entrophospora colombiana</i>	7969	Agrobiológicos Safer, Medellín (Colombia)	240 esporas/g

El fósforo se aplicó al momento de la siembra mientras que el nitrógeno y el potasio fueron aplicados 30 días después de la siembra (dds).

La aplicación de biofertilizantes se realizó con los productos descritos en la tabla 2. Las micorrizas arbusculares se aplicaron al momento de la siembra en una dosis de 40 g/planta. Azobac® y Fosforiz® fueron agregados 38 dds en las dosis recomendadas por el fabricante en dosis de 3 y 5 L ha<sup>-1</sup>, respectivamente.

### Diseño experimental

El experimento se realizó bajo un diseño de bloques completamente aleatorizados con un arreglo factorial 2×3×5, con tres repeticiones, dos tipos de suelo (Ciénaga de Oro-CIO y Turipaná-TUR), tres biofertilizantes (Azobac-AZO; Fosforiz-FOS y Micorrizas-MIC) y cinco niveles de fertilización (0, 25, 50, 75 y 100%). La unidad experimental (UE) en este estudio estuvo conformada por grupos de 10 plantas. Como variable respuesta, se determinó el peso fresco y seco de las raíces tuberosas a los 120 dds, en cada uno de los tratamientos. Se realizó un análisis de varianza y el Test de Fisher para comparación de medias. La correlación entre los datos de peso fresco y seco fue evaluada con el propósito de disminuir auto correlaciones en el análisis final. El peso fresco fue usado para determinar la acumulación relativa de biomasa (rBioAcc). Para todos los análisis y generación de gráficos se empleó el software estadístico Infostat (Rienzo *et al.*, 2015).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis para cada uno de los suelos indica que el suelo de Ciénaga de Oro (CIO) presentó textura arenosa, pH extremadamente ácido de 4,5, bajo contenido de materia orgánica (0,58%) y minerales representados como fósforo disponible (P) (1,2 mg kg<sup>-1</sup>) y potasio

intercambiable (K) (0,06 cmol<sub>(+)</sub> kg<sup>-1</sup>), en general este suelo tiene una baja calidad nutricional (Tab. 3). En contraste, el suelo de Turipaná (TUR) aunque presenta niveles bajos de P (25,44 mg kg<sup>-1</sup>) y K (0,67 cmol<sub>(+)</sub> kg<sup>-1</sup>), los valores superan significativamente a los encontrados en CIO, el contenido de materia orgánica es superior (2,57%), el pH se considera como normal (6,55) y la textura es franco-arcilloso, estas características hacen de este tipo de suelo favorable para el establecimiento de sistemas productivos de yuca (Suárez y Mederos, 2011).

Se encontraron efectos significativos del tipo de suelo (SLOC), biofertilizantes (BIOF) y niveles de NPK sobre la acumulación relativa de biomasa (rBioAcc). Adicionalmente, se presentaron interacciones significativas entre los siguientes factores: SLOC\*BIOF ( $P \leq 0,01$ ), SLOC\*NPK ( $P \leq 0,001$ ), BIOF\*NPK ( $P \leq 0,001$ ) y SLOC\*BIOF\*NPK ( $P \leq 0,01$ ) (Tab. 4).

Dentro de los 5 niveles de fertilización NPK sugeridos por Cadavid (2002), la respuesta de rBioAcc exhibió 2 puntos máximos, a niveles del 25 y 100% (Tab. 5).

Una mayor acumulación relativa de biomasa fue observada en los suelos arenosos (CIO) en comparación con los suelos arcillosos (TUR) (Tab. 3) (Fig. 1A). El mayor crecimiento relativo de las plantas de yuca en los suelos CIO en comparación con TUR puede ser explicado por el mayor efecto combinado de la fertilización NPK y BIOF en suelos más pobres (Tab. 4).

La carga de P y K (g/planta) aplicada en los suelos CIO es dos veces la aplicada a los suelos TUR en consideración a las diferencias intrínsecas en la fertilidad de los suelos evaluados. Por lo tanto, las especies de yuca se consideran muy dependientes de su hongo simbionte en condiciones ambientales menos fértiles (Carretero *et al.*, 2009). En el suelo de CIO el mayor incremento en la acumulación de rBioAcc está motivada por el aumento en la absorción del fósforo a

**Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de los dos tipos de suelos incluidos en la evaluación de factores que afectan la acumulación de biomasa en cultivos de yuca en función de NPK y biofertilizantes.**

Determinación analítica	Unidad	Método	Suelo Ciénaga de Oro		Suelo C.I. Turipaná	
			Valor	Interpretación	Valor	Interpretación
Textura al tacto		Organoléptico	A	Arenoso fuerte	FAr	Franco-arcilloso
pH		Potenciómetro	4,56	Extremadamente ácido	6,55	Extremadamente ácido
Conductividad eléctrica	dS m <sup>-1</sup>	Conductivímetro suelo: agua 1:2,5	0,12	No salino	0,31	No salino
Materia orgánica (MO)	%	Walkey y Black	0,58	NA	2,57	NA
Acidez intercambiable (Al+H)	cmol <sub>(+)</sub> kg <sup>-1</sup>	KCl	0,25	NA	0,00	NA
Aluminio intercambiable (Al)			0,00	NA	0,00	NA
Calcio intercambiable (Ca)			1,05	Bajo	10,07	Bajo
Magnesio intercambiable (Mg)		Acetato de amonio 1 N pH 7,0	0,53	Bajo	6,72	Bajo
Potasio intercambiable (K)			0,06	Bajo	0,67	Bajo
Sodio intercambiable (Na)			0,05	Normal	0,12	Normal
Capacidad de intercambio catiónico (CICE)			Suma de cationes	1,94	Bajo	17,58
Hierro disponible (Fe) Olsen		mg kg <sup>-1</sup>	Olsen modificado	61,40	Alto	80,60
Manganeso disponible (Mn) Olsen	20,80			Alto	4,80	Alto
Zinc disponible (Zn) Olsen	1,80			Medio	1,70	Medio
Cobre disponible (Cu) Olsen	1,80			Medio	7,30	Medio
Fosforo disponible (P) Bray II	Bray II		1,20	Bajo	25,44	Bajo
Azufre disponible (S)	Fosfato monobásico calcio		3,00	Bajo	8,90	Bajo
Boro disponible (B)			0,15	Bajo	0,32	bajo

NA: no aplica.

**Tabla 4. Análisis de varianza del efecto de tipo de suelos (SLOC), biofertilizantes (BIOF) y niveles de NPK sobre la acumulación relativa de biomasa (rBioAcc) en yuca.**

Fuente de variación	SS	df	MS	F	Valor P
Model.	3,8	39	0,1	3,69	<0,0001
SLOC	0,18	1	0,18	6,65	0,0112
BIOF	0,4	3	0,13	5,11	0,0024
NPK	0,95	4	0,24	8,99	<0,0001
SLOC*BIOF	0,31	3	0,1	3,93	0,0104
SLOC*NPK	0,57	4	0,14	5,45	0,0005
BIOF*NPK	1,04	12	0,09	3,3	0,0004
SLOC*BIOF*NPK	0,74	12	0,06	2,34	0,0103
Error	2,93	111	0,03		
Total	6,73	150			

través de hifas extra radicales de la micorriza, que permiten una absorción más eficiente de los nutrientes presentes en el suelo (Falcón, 2010), permitiendo que en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes como las presentes en los suelos de CIO, las plantas superen esas deficiencias generando resultados óptimos. En contraste, el hongo simbionte se ve favorecido con el incremento en el metabolismo vegetal ya que utiliza los productos de la planta como exudados y otros compuestos para realizar sus principales funciones (Cuesta *et al.*, 2007).

La evaluación del efecto de la adición de NPK sin biofertilizantes (CTRL), revela que la acumulación de biomasa es directamente proporcional a la concentración de NPK alcanzando el pico más alto con el 100% de fertilización. Para los tratamientos con adición de biofertilizantes se observa un punto máximo de acumulación de biomasa al 25% de fertilización NPK que está relacionado con el efecto de la interacción de estas dos variables (BIOF\*NPK) (Fig. 1B).

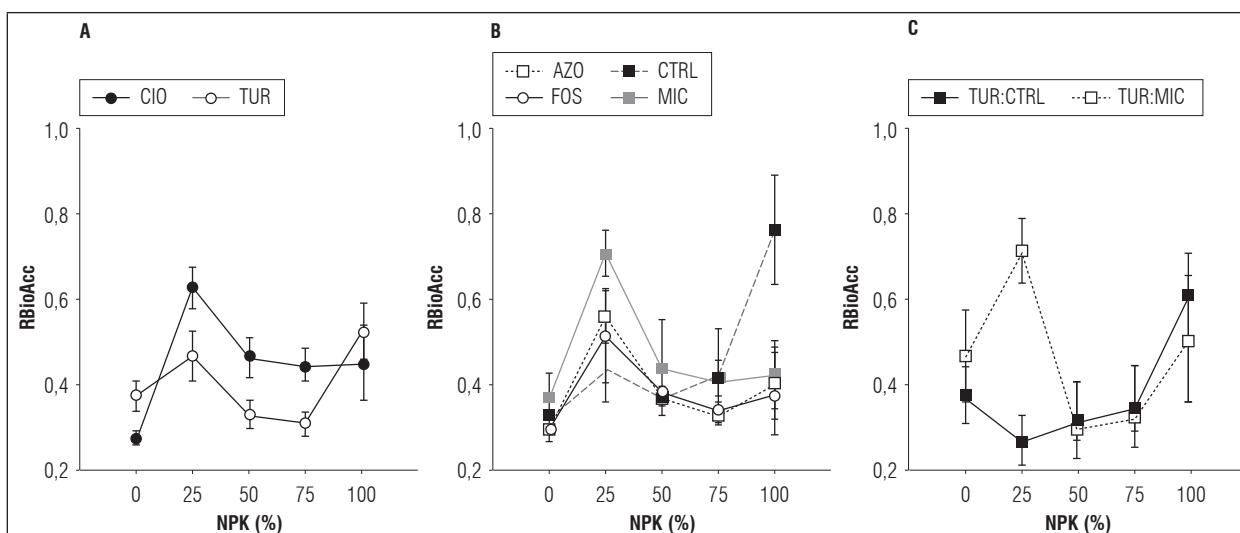
**Tabla 5. Efecto de tipo de suelos (SLOC), biofertilizantes (BIOF) y niveles de NPK sobre la acumulación relativa de biomasa (rBioAcc) en yuca.**

Factor	Acumulación relativa de biomasa		
	Media	SE	
<b>NPK (%)</b>			
0	0,32	0,02	a
25	0,55	0,04	d
50	0,41	0,03	bc
75	0,41	0,03	b
100	0,49	0,05	cd
	LSD: 0,07945		
<b>Tipo de suelos</b>			
TUR	0,40	0,02	a
CIO	0,47	0,03	b
	LSD: 0,05616		
<b>Biofertilizantes</b>			
FOS	0,36	0,03	a
AZO	0,39	0,03	a
MIC	0,49	0,04	b
CTRL	0,50	0,04	b
	LSD: 0,07947		

Promedios con letras distintas indican diferencia significativa según el test de Fisher ( $P \leq 0,05$ ).

SE: error estándar; TUR: Turipaná; CIO: Ciénaga de Oro; AZO: Azobac; FOS: Fosforiz; CTRL: control; MIC: Micorrizas.

La explicación más factible para los dos picos de respuesta observados es que la fertilización provoca efectos diferenciales sobre los microorganismos que hacen parte de los biofertilizantes, niveles bajos de fertilización incrementa el efecto de los microorganismos sobre la acumulación de la biomasa, pero niveles altos de fertilización inhiben su actividad. Reportes previos describen este tipo de efecto, donde la fertilización inorgánica tiene impacto negativo sobre la actividad biológica de microorganismos empleados como biofertilizantes (Carretero et al., 2009; Okon et al., 2010; Straker et al., 2010; Heberle et al., 2015; Séry et al., 2016; Begoude et al., 2016). En consideración a las limitantes económicas y al efecto inhibitorio de elevadas cantidades de fertilización, el punto máximo de respuesta en el que se tiene interés es aquél que se presente con la menor tasa de fertilización y para esta investigación se logró con el 25%. En el caso de los biofertilizantes, una mayor rBioAcc fue observada para micorrizas (MIC) en comparación con los biofertilizantes basados en bacterias de vida libre (AZO-FOS) (Tab. 5). El análisis de grupos homogéneos revela que no existen diferencias significativas entre el tratamiento CTRL y el inoculado con micorrizas. La interacción entre los niveles de NPK y BIOF sobre la acumulación de biomasa refleja que la combinación de NPK al 25% y MIC es capaz de igualar el efecto del tratamiento con fertilización completa sin biofertilizantes (NPK 100%) (Fig. 1B).



**Figura 1. Efecto de concentraciones de NPK sobre la acumulación relativa de biomasa (rBioAcc) de yuca en diferentes tipos de suelos (A) y biofertilizantes (B). Interacciones entre tipos de suelos y biofertilizantes fueron observados. La interacción más fuerte se presentó entre micorrizas en el suelo de naturaleza arcillosa (C). Las barras sobre los promedios significan desviación estándar. TUR: Turipaná; CIO: Ciénaga de Oro; AZO: Azobac; FOS: Fosforiz; CTRL: control; MIC: Micorrizas.**

El cultivo de yuca es considerado micotrófico en razón de su alta dependencia de las micorrizas que tiene efecto bioprotectante y sobre el crecimiento de la planta (Okon *et al.*, 2010; Straker *et al.*, 2010; Heberle *et al.*, 2015; Séry *et al.*, 2016; Begoude *et al.*, 2016). Esta asociación, le permite al cultivo un mayor crecimiento en la etapa inicial donde el sistema radicular es poco desarrollado (Filho y Nogueira, 2007), mejorar la eficiencia de las raíces para la extracción de nutrientes (Carretero *et al.*, 2009; Okon *et al.*, 2010; Séry *et al.*, 2016) y en consecuencia, el incremento en el rendimiento del cultivo (Séry *et al.*, 2016). Una de las especies de micorriza asociada a la yuca es *Glomus manihoti*, la cual es fuertemente invasiva, competitiva en el suelo y que tolera niveles altos de aplicación de fertilizante mejorando la absorción de nutrientes (Straker *et al.*, 2010). Esta especie hace parte de los componentes de Safer Micorrizas, por lo tanto, el notorio efecto de las micorrizas en este estudio puede estar justificado por el fuerte efecto de la presencia de esta especie en el producto utilizado que tiene en las etapas iniciales del cultivo.

Como resultado de la interacción de todos los factores evaluados (SLOC\*BIOF\*NPK) el efecto es notoriamente visible a una concentración del 25%, con el uso de micorrizas en suelos arcillosos (TUR) (Fig. 1C). Diferencias significativas fueron observadas para MIC y AZO a esta concentración (25%) en los suelos TUR, pero ninguna tendencia fue observada en los suelos CIO. Se encuentra reportado que en plantas colonizadas por micorrizas los requerimientos nutricionales son reducidos significativamente en comparación con las no micorrizadas (Filho y Nogueira, 2007), los resultados de esta investigación indican que hay un efecto notorio de estos microorganismos en suelos arcillosos. Adicionalmente, el beneficio de la aplicación de micorrizas se encuentra en la absorción de nutrientes resultando principalmente en el aumento del área de superficie de las raíces micorrizadas e incrementando la tasa de absorción del nutriente (Filho y Nogueira, 2007). También Straker *et al.* (2010) encontró en suelos arcillosos como el evaluado en esta investigación, la sinergia entre micorrizas y bajos niveles de fertilización (25%) en suelos promisorios para el desarrollo de la yuca (TUR), genera un efecto altamente significativo respecto a otras combinaciones.

## Conclusiones

El efecto más significativo del uso de biofertilizantes y fertilización NPK ocurrió en los suelos más pobres de Ciénaga de Oro. La mayor respuesta de rBioAcc

fue observada con el uso de micorrizas a bajas concentraciones de NPK. Este resultado sugiere que las actuales recomendaciones de fertilización están sobreestimadas y que entre los inoculantes microbianos disponibles los esfuerzos deben concentrarse en las micorrizas. Sin embargo, los resultados aquí presentados deben validarse en experimentos que incluyen rendimiento en condiciones controladas y de campo.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue desarrollada con recursos provenientes del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (CO5131 12104390011810B1) otorgados en el año 2013 y el apoyo logístico del Centro de Investigación Turipaná - Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). A partir de Junio del 2018, CORPOICA cambió su identidad legal a AGROSAVIA.

**Conflicto de intereses:** el manuscrito fue preparado y revisado con la participación de los autores, quienes declaran no tener algún conflicto de interés que coloquen en riesgo la validez de los resultados aquí presentados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera, M. 2012. La yuca en el Caribe colombiano. De cultivo ancestral a agroindustrial. Economía Regional 158. Banco de la República, Bogotá, Colombia.
- Begoude, D.A.B., P.S. Sarr, T.L.Y. Mpon, D.A. Owona, M.N. Kapeua y S. Araki. 2016. Composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars as influenced by chemical fertilization and tillage in Cameroon. J. Appl. Biosci. 98, 9270-9283. Doi: 10.4314/jab.v98i1.4
- Cadavid, L.F. 2002. Suelo y fertilización para la yuca. Serie la yuca en el tercer milenio. CIAT, Cali, Colombia.
- Carretero, C.L., M. Cantos, J.L. García, R. Azcón y A. Troncoso. 2009. Growth responses of micropropagated cassava clones as affected by *Glomus Intraradices* colonization. J. Plant Nutr. 32(2), 261-273. Doi: 10.1080/01904160802608601
- Cuesta, I., E. Rengifo y M. Pérez. 2007. Influencia de diferentes dosis de *Glomus mosseae* sobre plántulas de *C. odorata*. En: Memorias 4º Congreso Forestal de Cuba. La Habana, Cuba.
- DANE (Departamento Administrativo Nacional de Estadística). 2004. Censo de producción de yuca para uso industrial. Separata de resultados. Bogotá, Colombia.
- Falcón, E. 2010. Efecto de la aplicación de micorrizas arbusculares sobre la producción de posturas de Caoba del



- país (*Swietenia mahagoni* L. Jacq.) Homb. Cienc. Tecn. 14, 1-11.
- FAO. 2016. Cassava production statistics. En: Faostat, <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>; consulta: enero de 2018.
- Filho, A.C. y M.A. Nogueira. 2007. Microbiota de solo e qualidade ambiental. Instituto Aronómico, Campinas, Brasil.
- Grageda, O.A., A. Díaz, J.J. Peña y J.A. Vera. 2012. Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. Rev. Mex. Cienc. Agric. 3(6), 1261-1274.
- Heberle, E.D.S., R.D.D. Armas, D.A. Heberle, S.L. Stürmer, L.A.M. Peruch, P.E. Lovato y C.R.E.S. Soares. 2015. Occurrence and structure of arbuscular mycorrhizal fungal communities in cassava after cultivation of cover crops as observed by the "PCR-DGGE" technique. Rev. Bras. Ciênc. Solo 39(5), 1292-1301. Doi: 10.1590/01000683rbc20140216
- Howeler, R. 2014. Sustainable soil and crop management of cassava in Asia: a reference manual. CIAT Publication No. 389. CIAT, Cali, Colombia.
- João, J.P., A. Ruiz Martínez, L. Simó González y R. Rivera Espinosa. 2016. Efectividad de cepas de HMA en el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en dos tipos de suelos. Rev. Cult. Trop. 37(1), 48-56.
- Lugtenberg, B. y F. Kamilova. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu. Rev. Microbiol. 63, 541-556. Doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918
- MADR (Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural). 2003. Manejo social del campo 2002-2006. Bogotá, Colombia.
- Molina, L., L. Mahecha y S. Medina. 2005. Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en el establecimiento de árboles en sistemas silvopastoriles. Rev. Colomb. Cienc. Pecu. 18(2), 162-175.
- Okon, I.E., M.G. Solomon y O. Osonubi. 2010. The effects of arbuscular mycorrhizal fungal inoculation and mulch of contrasting chemical composition on the yield of cassava under humid tropical conditions. Sci. World J. 10, 505-511. Doi: 10.1100/tsw.2010.59
- Rienzo, J.A., F. Casanoves, M. Balzarini, L. González, M. Tablada y C.W. Robledo. 2015. Infostat. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Sánchez de Prager, M. 1999. Endomicorrizas en agroecosistemas colombianos. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia.
- Séry, D.J.-M., Z.G.C. Kouadjo, B.R.R. Voko y A. Zézé. 2016. Selecting native arbuscular mycorrhizal fungi to promote cassava growth and increase yield under field conditions. Front. Microbiol. 7, 2063. Doi: 10.3389/fmicb.2016.02063
- Straker, C.J., A.J. Hilditch y M.E.C. Rey. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in South Africa. S. Afr. J. Bot. 76(1), 102-111. Doi: 10.1016/j.sajb.2009.09.005
- Suárez, L. y Mederos, V. 2011. Apuntes sobre el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tendencias actuales. Cult. Trop. 32(3), 27-35. Doi: 10.3389/fmicb.2016.02063
- Sylvia D.M., J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel y D.A. Zuberer. 1999. Principles and applications of soil microbiology. Ed. Prentice Hall Inc, Upper Saddle River, NJ, USA.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255, 571-586. Doi: 10.1023/A:102603721689
- Vila, O. 2012. Diagnóstico de la cadena de la yuca en Colombia. Generalidades y situación actual del cultivo de la yuca en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), Bogotá, Colombia.

# Efecto del compost de residuos orgánicos domiciliarios, vegetales y estiércol en el crecimiento de lechuga

Effect of organic residue compost made from household waste, plant residues and manure on the growth of lettuce

DAIANNI ARIANE DA COSTA FERREIRA<sup>1</sup>  
NILDO DA SILVA DIAS<sup>1</sup>  
ANA KALINE DA COSTA FERREIRA<sup>1</sup>  
CYBELLE BARBOSA E LIMA VASCONCELOS<sup>1</sup>  
FRANCISCO SOUTO DE SOUSA JUNIOR<sup>2</sup>  
VANIA CHRISTINA NASCIMENTO PORTO<sup>1</sup>  
CLEYTON DOS SANTOS FERNANDES<sup>2, 4</sup>  
MANUEL ANTONIO NAVARRO VÁSQUEZ<sup>3</sup>



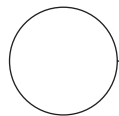
**Estudio con lechuga orgánica.**

Foto: D.A.d.C. Ferreira

## RESUMEN

El compostaje se presenta como una alternativa para reciclar residuos sólidos orgánicos biodegradables, transformarlos en fertilizantes para la agricultura y evitar su deposición inadecuada en rellenos sanitarios. De esta forma, el objetivo del presente estudio fue evaluar la calidad físico-química y microbiológica de un compost producido a partir de residuos orgánicos y su desempeño en el desarrollo y productividad del cultivo de lechuga crespa (*Lactuca sativa* L.), en condiciones de invernadero. La materia prima del compostaje fueron residuos orgánicos domiciliarios (restos de alimentos) y estiércol de bovino en proporción 1:1. Para la construcción de los montículos de compost, los residuos orgánicos fueron mezclados con podas de árboles triturados. Diferentes concentraciones de compost madurado, 20, 40, 60, 80 y 100%, fueron incluidos en el sustrato de lechuga en un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. Los resultados mostraron que el compost orgánico producido presentó características físico-químicas y microbiológicas dentro de los rangos de utilización agronómica y su adición en el sustrato de fibra de coco, favoreció la producción de lechuga, promoviendo un incremento de 63% en la altura de plantas y 75% en el número de hojas.

**Palabras clave adicionales:** *Lactuca sativa* L., fertilización, agricultura urbana, manejo de residuos, producción de hortalizas.



<sup>1</sup> Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Campus Oeste, Mossoro-RN (Brasil). ORCID Ferreira, D.A.d.C.: 0000-0002-9878-061X; ORCID Dias, N.d.S.: 0000-0002-1276-5444; ORCID Ferreira, A.K.d.C.: 0000-0001-7739-574X; ORCID Vasconcelos, C.B.e.L.: 0000-0003-1463-1148; ORCID Porto, V.C.N.: 0000-0002-0352-0162

<sup>2</sup> Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Campus Angicos, Angicos-RN (Brasil). ORCID Sousa Júnior, F.S.d.: 0000-0003-2599-0023; ORCID Fernandes, C.d.S.: 0000-0002-9465-2637

<sup>3</sup> Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceara (IFCE), Crato-CE (Brasil). ORCID Vásquez, M.A.N.: 0000-0001-6207-1603

<sup>4</sup> Autor para correspondencia. cleyton1959@hotmail.com

## ABSTRACT

Composting is an alternative for recycling biodegradable organic solid wastes, turning them into fertilizers for agriculture and avoiding improper disposal in landfills. Thus, the objective of the present study was to evaluate the physical-chemical and microbiological quality of a compound produced from organic residues and its performance in the development and productivity of a crisp lettuce cultivar (*Lactuca sativa* L.), in greenhouse conditions. For the compost, household waste (food residue) and cattle manure were used at a 1:1 ratio. For the construction of the compost piles, the organic residues were mixed with wood chips. Different concentrations of the mature compost (20, 40, 60, 80, and 100% compost) were evaluated in the lettuce cultivation substrate in a randomized block design, with three replicates. The results showed that the organic compost had physical-chemical and microbiological characteristics within agronomic use patterns that, when added to the coconut fiber substrate, favored lettuce production, promoting a 63% increase in plant height and 75% increase in the number of leaves.

**Additional key words:** *Lactuca sativa* L., fertilization, urban agriculture, waste management, vegetable production.

Fecha de recepción: 27-03-2018 Aprobado para publicación: 30-05-2018

## INTRODUCCIÓN

Buena parte de los residuos sólidos producidos actualmente no poseen un destino sanitaria y ambiental adecuado. A pesar de avances en los últimos años, los residuos todavía son depositados en basurales a cielo abierto en más de la mitad de los municipios brasileños (Gouveia, 2012); de estos residuos más del 50% son orgánicos (Maragno *et al.*, 2007).

El gran problema ambiental de la deposición de estos residuos en basurales y rellenos sanitarios son la elevada producción de líquidos (lixiviados) que puede fácilmente infiltrarse y contaminar el suelo, además, de las aguas del nivel freático y subterráneas. Con la expansión y alta densidad de las urbes, estos problemas tienen a empeorar teniendo en cuenta que la mayoría de las ciudades brasileñas no proyectan el ritmo acelerado de su crecimiento con infraestructura sanitaria adecuada (Rezende *et al.*, 2013; Cotta *et al.*, 2015).

La gestión de residuos sólidos orgánicos es un problema que enfrenta una gran parte de los países en desarrollo, debido al ritmo acelerado de crecimiento de la población, de la actividad económica y de la urbanización e industrialización que intensifican el proceso de generación de esos residuos (Srivastava *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2017; Butu y Mshelia, 2014).

El gran desafío de las instituciones gubernamentales es garantizar la destinación adecuada de los residuos orgánicos de forma que evite impactos negativos al medio ambiente, promoviendo la implantación de un

sistema de manejo diferenciado y un tratamiento de residuos sólidos que promueva la segregación de las fuentes generadoras, minimice los impactos ambientales y maximice los beneficios sociales y económicos para la población (Albertin *et al.*, 2010). En algunos países desarrollados, como Polonia, la gestión de residuos sólidos orgánicos es considerado una de las actividades más importantes de la protección ambiental (Boer *et al.*, 2010).

El reciclaje de residuos orgánicos por medio de proceso de compostaje se viene constituyendo como el principal medio de tratamiento ante la gran cantidad de residuos que llegan a los rellenos sanitarios (Maragno *et al.*, 2007), donde la masa de residuo es tratada y transformada en un nuevo producto, mediadas por microorganismos en abono orgánico (Pereira Neto, 2007; Yu y Huang, 2009; Lesteur *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013) y que puede ser utilizado como fertilizante en la agricultura (Pedrosa *et al.*, 2013; Dores-Silva *et al.*, 2013), garantizando así la deposición segura de estos materiales en el ambiente (Figueiredo y Tanamati, 2010; Montemurro *et al.*, 2010) y reduciendo el uso de fertilizantes convencionales.

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar las características químicas, físicas y biológicas de un compost producido a partir de residuos orgánicos domiciliarios y vegetales, y su desempeño en el desarrollo y productividad del cultivo de lechuga crespa, cultivada en invernadero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación fue desarrollada entre agosto de 2015 y marzo de 2016. Se realizaron dos etapas, la primera en la producción de compost y la segunda el cultivo de lechuga con el compost generado en condiciones de invernadero.

### Producción de compost

La primera etapa de la investigación fue desarrollada en campo abierto en el municipio de Mossoró, Rio Grande do Norte (en Asociación Comunitaria Reciclando para la Vida, ACREVI), ubicado a 5°14'9" S y 37°18'59" W, a 18 msnm.

Según la clasificación de Köppen, el clima de la región es de tipo seco y muy caliente (BSwh1). La precipitación pluviométrica es bastante irregular con media anual de 673,9 mm y una estación seca que generalmente comprende el período de junio a enero y la estación lluviosa entre febrero y mayo. La temperatura media anual de 27°C y la humedad relativa del aire presenta una media de 68,9% (Carmo Filho y Oliveira, 1995). En el momento del compostaje, entre septiembre y diciembre de 2015, la temperatura media registrada fue de 28,4°C y la humedad media de 59,5% (Fig. 1).

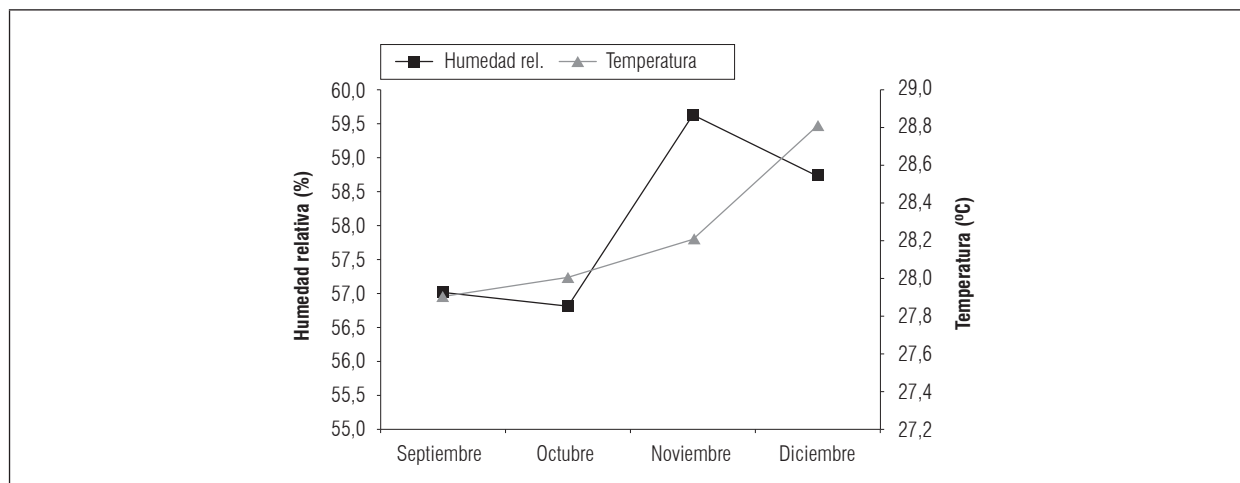
El proceso de compostaje fue realizado con montículos directamente sobre el suelo teniendo como materia prima tres materiales: residuos orgánicos domiciliarios (restos de alimentos), residuos vegetales (podas de árboles) y estiércol bovino.

Los residuos alimenticios fueron obtenidos durante la colecta selectiva realizada por la ACREVI en el restaurante popular "Barriga Cheia" del municipio de Mossoró. Los residuos vegetales fueron colectados por el servicio de limpieza urbana del municipio de Mossoró y, posteriormente, fueron triturados con una desbrozadora marca Vermeer (modelo BC1000XL de 85 hp, Vermeer Corporation, Pella, IA, USA). El estiércol bovino fue obtenido del área de bovinos de la Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA, Mossoró-RN, Brasil).

Para la construcción de los montículos de compostaje se siguió la metodología "Windrow" (Pereira Neto, 2007), que tuvieron la forma cónica de dimensiones 1,60 m de altura y 2,00 m de diámetro y peso total aproximado de 550 kg. Se aplicaron los residuos en capas alternas de 30 cm de residuo vegetal, 5 cm de residuos domiciliarios y 5 cm de estiércol bovino hasta la altura deseada. Después de cada capa, el montículo era regado de forma uniforme, con agua proveniente de la Companhia de Águas e Esgotos do Rio Grande do Norte (CAERN) (Natal-RN, Brasil).

La mezcla o revuelta de los montículos para su aireación fue realizada de forma manual cada 3 d después de iniciar el compostaje y luego cada 10 d. Se aplicó el riego manual y diariamente. Para disminuir la evaporación del agua en el montículo se cubrió con hojas secas de coquero.

Para verificar la maduración del compostaje fueron realizadas pruebas de mano y de bola descritos por Kiehl (2002). Además, en el momento del muestreo



**Figura 1. Humedad relativa y temperatura media del aire en el momento de realizar el compostaje. Fuente: Instituto Nacional de Meteorología (INMET, 2016).**

para los análisis de laboratorio se aplicó el método de independencia de la muestra. Las muestras fueron acondicionadas en sacos plásticos, identificadas y enviadas al Laboratorio de Agua, Suelo y Planta (LASAP) de la UFERSA para la determinación de las propiedades físico-químicas (Embrapa, 2009) y microbiológicas (APHA, 2012).

Se determinaron las propiedades químicas P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, Ni, Cd y Pb en dos momentos: una después de la construcción del montículo y otra al final del proceso de compostaje. A los 0, 30, 60 y 90 d después de la construcción de los montículos se realizó la medición del carbono orgánico total, sustancias húmicas, nitrógeno total y relación C/N.

La caracterización microbiológica del compost fue determinada por conteo de microorganismos a través del método del número más probable (NMP). Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Inspección de Productos de Origen Animal (LIPOA) de la UFERSA. Inicialmente, se evaluó la presencia de coliformes totales y termotolerantes. Posteriormente, la detección de *Salmonella* sp. fue realizada por el enriquecimiento de los medios líquidos selectivos *Rappaport vassiliadis*, selenito-cistina y tetratiónato.

Al finalizar el proceso de compostaje con la degradación de la mayor parte de los residuos adicionados al montículo, el material fue tamizado para la separación del material grueso, y el compuesto humificado fue acondicionado en sacos plásticos para su transporte.

## Producción de lechuga

La segunda etapa del trabajo fue desarrollada entre febrero y marzo de 2016 en la UFERSA, Campus Oeste, en Mossoró-RN, localizada en las coordenadas geográficas 5°11' S y 37°20' W a 18 msnm. El diseño experimental utilizado para evaluar la viabilidad del compost en la producción de lechuga fue bloques al azar con 5 tratamientos y 3 repeticiones. Los tratamientos consistieron en diferentes dosis del compost

preparado de la primera etapa en proporción de 20, 40, 60, 80 y 100%, mezclado con el sustrato de fibra de coco. La unidad experimental se formó por 10 plantas.

Se empleó lechuga var. Vera, tipo crespa, producida en bandejas de poliestireno expandido de 128 celdas con humus de lombriz. Se realizó el trasplante a los 23 d después de la siembra cuando presentaban entre 5 a 6 cm de altura y 5 hojas definitivas.

El cultivo de lechuga se realizó en canaletas de PVC tipo trapecio con 3 m de largo, 0,2 m de ancho y distancia entre plantas de 0,3 m. Las canaletas fueron fijadas a un soporte de madera de 0,90 m del suelo con pendiente del 3%; se realizaron perforaciones cada 0,5 m para drenar el exceso de agua.

El riego se aplicó diariamente en dos momentos, al inicio de la mañana y final de la tarde. Se implementó un sistema de riego por goteo con emisores distanciados cada 0,3 m y un caudal de 2,5 L h<sup>-1</sup>. El agua utilizada provenía del pozo de abastecimiento de la UFERSA (Tab. 1).

A los 35 días después del trasplante (dat), fueron evaluados los parámetros de crecimiento, macro y micronutrientes y parámetros microbiológicos en las plantas de lechuga. Los parámetros de crecimiento evaluados fueron: número de hojas por planta (NHP), diámetro del tallo (DT), altura de la parte aérea (APA), masa fresca de la parte aérea (MFPA), masa seca de la parte aérea (MSPA), masa fresca de la raíz (MFR) y masa seca de la raíz (MSR).

Las plantas fueron secas en estufa con circulación de aire forzado a temperatura de 65°C, hasta presentar masa constante y, en seguida, fue determinada la producción de masa seca. Después de pesadas, las muestras fueron trituradas y acondicionadas en recipientes herméticamente cerrados para realizar los análisis de nutrientes (N, Ca, Mg, Cu, Zn, Fe, Mn), utilizando espectroscopio de absorción atómica modelo AA 240

**Tabla 1. Caracterización físico-química de agua de riego utilizada en el cultivo de lechuga producida con compost de residuos vegetales, orgánicos y estiércol bovino.**

Fuente	CE (dS m <sup>-1</sup> )	pH	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>3-</sup>	RAS
			mmol <sub>e</sub> L <sup>-1</sup>						mg L <sup>-1</sup>
PA	0,55	7,5	1,0	0,9	4,44	2,4	0,7	3,4	4,6

PA: pozo de abastecimiento; CE: conductividad eléctrica; CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>: carbonato; HCO<sub>3</sub><sup>3-</sup>: bicarbonato; RAS: reacción de adsorción de sodio.



FS (Agilent, Technologies, Santa Clara, CA, USA). Las concentraciones de los macronutrientes P y K fueron determinadas por calorimetría, utilizándose espectrofotómetro de llama, modelo DR-62 (Digimed, São Paulo-SP, Brasil).

El análisis microbiológico fue realizado en el Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) de la UFERSA, por el método de blanqueamiento en superficie, de acuerdo con la metodología descrita en el *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* de la APHA (American Public Health Association, Washington, DC, USA).

Los datos obtenidos en el experimento fueron sometidos a un análisis de variancia empleando la prueba F y en caso de significancia la prueba de Tukey al 1 y 5% de probabilidad. Además, se realizó un análisis de regresión para los datos cuantitativos, utilizando el software ASSISTAT 7.7.

## RESULTADOS

### Cualidad nutricional del compost

El análisis de la materia prima utilizada en el compostaje (residuos sólidos orgánicos domiciliarios, residuos vegetales y estiércol bovino), presentó la mayor concentración de calcio, además, el hierro, manganeso y zinc (Tab. 2).

**Tabla 2. Macro y micronutrientes en la materia prima (residuos orgánicos y vegetales + estiércol bovino) al inicio de compost.**

Macronutrientes	Concentración (g kg <sup>-1</sup> )	Micronutrientes	Concentración (mg kg <sup>-1</sup> )
N	0,74	Fe	1.345,00
P	0,75	Cu	5,70
K	5,25	Mn	31,45
Ca	19,71	Zn	26,35
Mg	2,40	Ni	2,80
		Cd	0,50
		Pb	9,50

La concentración de N fue mayor en el compost estabilizado que al inicio del compostaje (materias primas); para los demás macronutrientes la concentración disminuyó durante el proceso. La concentración de los micronutrientes Fe, Mn y Zn, el proceso de compostaje aumentó en comparación de la materia

prima. Los contaminantes químicos como Cd y Pb se redujeron y se elevaron los niveles de Ni (Tab. 2 y 3).

**Tabla 3. Metales pesados, macro y micronutrientes en el compost estabilizado con residuos orgánicos domiciliarios.**

Macro y micronutrientes (mg kg <sup>-1</sup> )					Metales pesados (mg kg <sup>-1</sup> )		
N	Fe	Cu	Mn	Zn	Ni	Cd	Pb
0,83	1.826,0	4,80	47,75	41,90	5,25	0,15	0,50

La evolución del carbono orgánico total (COT) mostró decrecimiento a lo largo del proceso de compostaje (Fig. 2A). El nitrógeno total presentó pequeña reducción en la concentración en los primeros 30 d del proceso de compostaje manteniéndose constante durante todo el proceso de compostaje (Fig. 2B). El fraccionamiento de la materia orgánica durante el periodo de estabilización del compost (Tab. 4), demuestra que las sustancias húmicas están presentes en la siguiente orden de concentración: humina > ácidos fúlvicos > ácidos húmicos. La relación C/N inicia con una proporción 26/1 y finaliza en 12/1 (Fig. 3).

**Tabla 4. Caracterización de los ácidos húmicos (C-AH), fúlvicos (C-AF) y huminas (H) para montículos de compost con residuos orgánicos domiciliarios.**

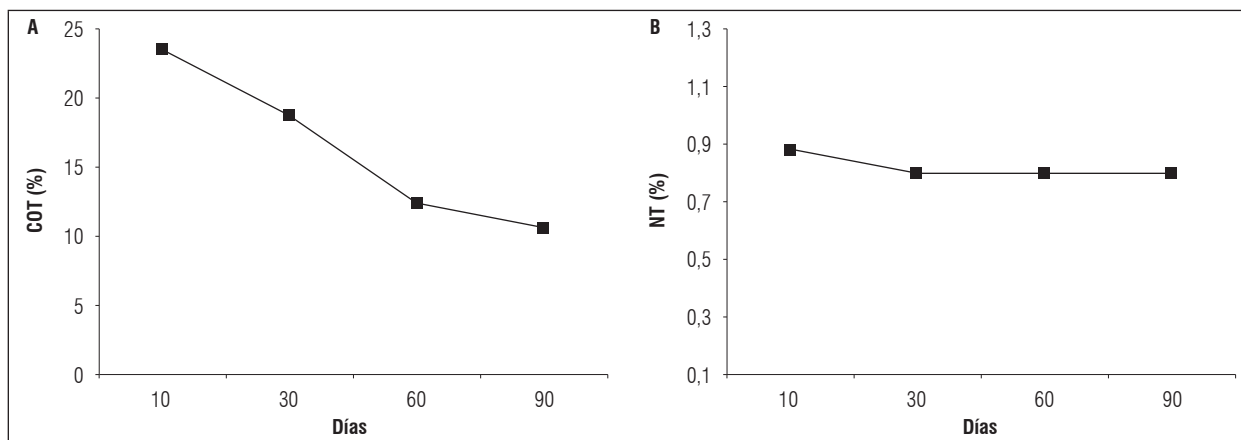
Período (d)	Fracciones orgánicas (dag kg <sup>-1</sup> )		
	C-AH	C-AF	H
0	2,01	2,38	29,36
30	0,59	0,62	18,44
60	0,28	0,34	15,66
90	0,27	0,21	13,79
% final	1,9	1,5	96,6

dag: decagramo

La estabilización del compost permitió que en los análisis microbiológicos se evidenciara la eliminación de los microorganismos patogénicos, coliformes totales, termotolerantes y Salmonelle durante el compostaje; los valores encontrados estuvieron por debajo del límite detectado, con cifras menores a 0,3; 0,0 y negativo, respectivamente.

### Producción de lechuga

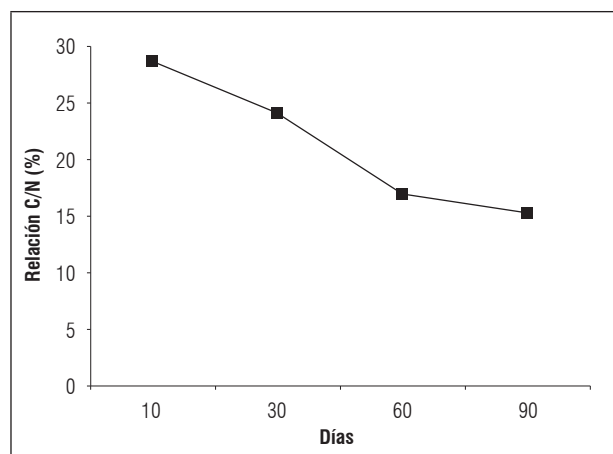
El análisis de variancia para las características evaluadas en la planta de lechuga, permitió identificar



**Figura 2.** Concentración de carbono orgánico total (COT) (A) y nitrógeno total (NT) (B) en el montículo de compost con residuos orgánicos urbano a lo largo de 90 d.

diferencias significativas en las variables altura de plantas (AP) y número de hojas (NF) en los tratamientos aplicados (Tab. 5).

La altura de planta y el número de hojas aumentaron linealmente con las dosis crecientes de compostaje (Fig. 4), donde la dosis más alta de compost (100%) presentó los mejores valores para estas variables.



**Figura 3.** Relación carbono/nitrógeno (C/N) en el compostaje de residuos orgánicos domiciliarios.

En la tabla 6 se presentan los valores medios para las variables DT, MFPA, MSPA, MFR y MSR que no presentaron diferencias significativas entre las diferentes dosis de compost.

Con respecto al análisis de variancia para las concentraciones medias de nutrientes en las plantas de lechuga, los tratamientos presentaron diferencias significativas al nivel de 1% de probabilidad para los niveles de nitrógeno, calcio y magnesio (Tab. 7).

Las concentraciones de N, Ca y Mg se elevaron en las plantas de lechuga conforme aumentaba la dosis de compostaje (Tab. 8). Se encontraron mayores contenido de N en las dosis 80 y 100% con diferencias significativas con los demás tratamientos. Con respecto a los contenidos de Ca y Mg, sobresalieron las dosis

**Tabla 5.** Análisis de variancia para componentes de crecimiento y desarrollo de lechuga, cultivadas con diferentes dosis de compostaje de residuos orgánicos domiciliarios.

Fuente de variación	GL	AP	DT	NF	MFPA	MSPA	MFR	MSR
Bloques	2	2,57 <sup>ns</sup>	0,1 <sup>ns</sup>	2,24 <sup>ns</sup>	58,58 <sup>ns</sup>	0,11 <sup>ns</sup>	1,83 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>
Tratamientos	4	6,7 <sup>*</sup>	0,87 <sup>ns</sup>	9,87 <sup>**</sup>	122,23 <sup>ns</sup>	0,41 <sup>ns</sup>	7,26 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>
Residuo	8	1,73	1,73	1,24	32,37	0,22	4,44	0,54
CV %		13,52	25,24	10,71	52,22	43,53	39,10	45,74

AP: altura de plantas, DT: diámetro de tallo (DH), NH: número de hojas, MFPA: masa fresca de la parte aérea, MSPA: masa seca de la parte aérea, MFR: masa fresca de la raíz, MSR: masa seca de la raíz.

\*\* significancia a  $P \leq 0,01$ , \* significancia a  $P \leq 0,05$ , <sup>ns</sup> no significativo con la prueba F. GL: grados de libertad; CV: coeficiente de variación.

**Tabla 6. Componentes de crecimiento y desarrollo de lechuga, cultivadas con diferentes dosis de compostaje de residuos orgánicos domiciliarios.**

Dosis de compost (%)	DT (mm)	MFPA (g/planta)	MSPA (g/planta)	MFRAIZ (g/planta)	MSRAIZ (g/planta)
20	4,63 a	5,62 a	0,84 a	4,19 a	0,58 a
40	4,78 a	5,46 a	0,68 a	3,43 a	0,42 a
60	5,23 a	8,7 4a	0,94 a	5,76 a	0,45 a
80	5,40 a	14,30 a	1,28 a	7,24 a	0,61 a
100	5,98 a	20,35 a	1,61 a	6,23 a	0,49 a
DMS	3,71	16,06	1,31	5,94	0,65

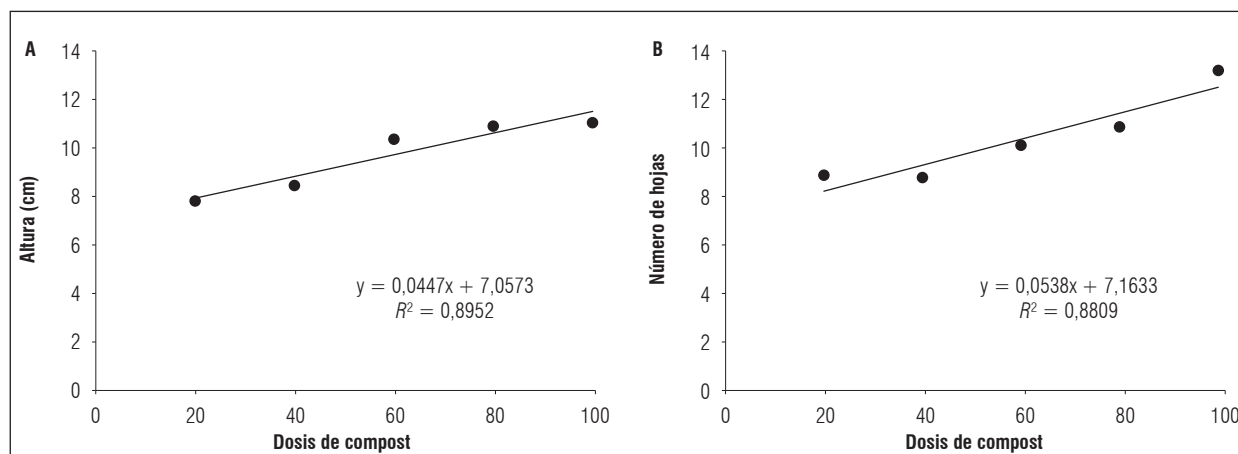
AP: altura de plantas, DT: diámetro de tallo (DH), NH: número de hojas, MFPA: masa fresca de la parte aérea, MSPA: masa seca de la parte aérea, MFR: masa fresca de la raíz, MSR: masa seca de la raíz

Promedios con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ); DMS: diferencia mínima significativa.

**Tabla 7. Análisis de variancia para la concentración de nutrientes en la planta de lechuga, cultivada con diferentes dosis de compostaje de residuos orgánicos domiciliarios.**

Fuente de variación	GL	N	P	K	Ca	Mg	Cu	Mn	Fe	Zn
Bloques	2	0,50 <sup>ns</sup>	0,11 <sup>ns</sup>	0,29 <sup>ns</sup>	3,62 <sup>ns</sup>	0,45*	38,86**	18,58 <sup>ns</sup>	509,07 <sup>ns</sup>	219,38 <sup>ns</sup>
Tratamientos	4	160,64**	0,02 <sup>ns</sup>	0,13 <sup>ns</sup>	26,59**	0,76**	1,57 <sup>ns</sup>	260,39 <sup>ns</sup>	546,16 <sup>ns</sup>	58,13 <sup>ns</sup>
Residuo	8	3,26	0,05	0,09	2,67	0,09	1,75	154,31	347,03	98,26
CV%		8,17	13,87	10,12	19,81	13,31	46,93	29,74	33,40	17,38

\*\* significancia a  $P \leq 0,01$ , \* significancia a  $P \leq 0,05$  y <sup>ns</sup> no significativo con la prueba F. GL: grados de libertad; CV: coeficiente de variación.

**Figura 4. Altura de planta (A) y número de hojas (B) en plantas de lechuga cultivadas con diferentes dosis de compostaje con residuos orgánicos domiciliarios.**

60, 80 y 100% sin diferencias entre estas, pero sí con las demás.

Se encontraron coliformes totales en muestras de humedad de las hojas de lechuga (al natural), en recuentos a 45°C para los diferentes tratamientos. Se

constataron valores de 20, 35, 40, 50 y 70 UFC/g en las lechugas producidas con las dosis de 20, 40, 60, 80 y 100% de compost, respectivamente. No obstante, estos resultados se encuentran dentro de los límites establecidos en la Resolución – RDC 12/2001 de la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA),

**Tabla 8. Macro y micronutrientes foliares en plantas de lechuga establecidas en diferentes dosis de compostaje de residuos orgánicos domiciliarios.**

Dosis de compost (%)	Nutrientes								
	N	P	K	Ca	Mg	Cu	Mn	Fe	Zn
	(g kg <sup>-1</sup> )					(mg kg <sup>-1</sup> )			
20	14,1 c	1,62 a	2,97 a	5,12 b	1,97 b	2,33 a	38,61 a	56,16 a	52,22 a
40	15,9 c	1,46 a	2,79 a	5,31 b	1,73 b	2,31 a	37,63 a	36,95 a	54,98 a
60	22,07 b	1,64 a	3,29 a	9,23 ab	2,35 ab	2,23 a	30,27 a	49,58 a	60,56 a
80	26,93 ab	1,62 a	2,80 a	9,47 ab	2,26 ab	3,61 a	53,55 a	72,11 a	54,76 a
100	31,5 a	1,64 a	3,06 a	12,07 a	3,06 a	3,62 a	48,77 a	64,06 a	62,73 a
DMS	5,10	0,63	0,85	4,61	0,86	3,74	35,07	52,59	27,98

Promedios con letras distintas indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ); DMS: diferencia mínima significativa.

que define los niveles aceptables de coliformes en alimentos de consumo humano ( $10^2$  UFC/g). No se encontró la presencia de *Salmonella* sp. en ninguna de las muestras analizadas.

## DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos es posible aprovechar los residuos sólidos orgánicos y vegetales urbanos, además, de obtener un compost de calidad para ser utilizado en la producción de hortalizas. Esto es confirmado puesto que el compost obtenido presenta excelente grado de maduración y un alto valor nutricional para la producción vegetal. Además, el proceso de compostaje de los residuos empleado demostró ser una alternativa viable.

El compost madurado presentó una tendencia general de reducción de macro, micronutrientes y metales pesados, con excepción del N, Fe, Mn y Zn, que tuvieron valores superiores en comparación a la materia prima. El beneficio del proceso de compostaje es la disponibilidad de nutrientes presentes en las materias primas para las plantas.

La pérdida de nutrientes en el proceso de descomposición de los residuos orgánicos ocurrieron, probablemente, debido a la lixiviación de los mismos, provocado por los niveles de riego necesarios para mantener la humedad del montículo. Según Valente *et al.* (2009), la humedad en el proceso de compostaje tiene mucha importancia en el desarrollo de los microorganismos y debe situarse entre el 50 y 60%. Los compostajes con niveles inferiores al 30% de humedad, inhiben la actividad microbiana y por encima

de 65% proporciona una descomposición lenta, generada por condiciones anaerobiosis y lixiviación de nutrientes.

La relación C/N al inicio del compostaje fue alrededor de 26/1. Según Selle (2007), para que haya equilibrio en los procesos bioquímicos de inmovilización y mineralización del N, es necesario que la relación C/N sea en torno al 25%. La evaluación del carbono orgánico en el montículo de compost, mostró una reducción en el tiempo que transcurrió la descomposición de los residuos en el montículo. Probablemente, este hecho ocurrió debido al crecimiento de microorganismos que utilizaron la fuente de carbono ofertada (Mees *et al.*, 2009), de este modo, el aumento de la actividad microbiana en los primeros días de descomposición se debe a la mayor disponibilidad de carbono en este período, así como la presencia de una fuente de materia orgánica fácilmente asimilable (Ortiz *et al.*, 2012).

En estudios similares de compostaje, el contenido de carbono disminuyó con el progreso de la descomposición (Mees *et al.*, 2009). Considerando que las concentraciones de C giran en torno al proceso de descomposición de la materia orgánica, y que a través de la actividad microbiana, los residuos orgánicos son transformados en material humificado. El compostaje de diferentes residuos orgánicos favorecieron la reducción del COT debido a la mineralización de la materia orgánica (Silva y Mendonça, 2007).

La reducción del contenido de COT también se encuentra relacionado con la fracción soluble de las fibras del material orgánico descompuesto. En el proceso de compostaje se presenta un predominio de los

ácidos fúlvicos (AF) en relación a los ácidos húmicos (AH), pero esto cambia al final del proceso de compostaje. El proceso de degradación de los compuestos polisacáridos y aminoácidos, permite la mayor solubilidad relativa de los AF en medio ácido y básico, proporcionando mayor desarrollo de la actividad microbiana. Estos resultados también fueron obtenidos por Silva *et al.* (2009), quienes analizan las fracciones del componente orgánico y observan que los ácidos fúlvicos y huminas fueron superiores a los de ácidos húmicos al final de la estabilización del compostaje.

En relación a los nutrientes aportados por el compostaje, en el trabajo de Batista y Vinhal (2010), los contenidos de Ca, K y N, fueron los de mayor concentración en el compost, seguidos de Fe, Zn, Mn, Cu y B, en menores proporciones. De acuerdo con estos autores, los residuos sólidos orgánicos domiciliarios (de origen doméstico), son una importante fuente de materia orgánica, proporcionando nutrientes esenciales para las plantas, los cuales pueden estar disponibles cuando el compostaje es adicionado al suelo.

Con respecto a la potencialidad del compost en la agricultura, es indispensable una rigurosa descomposición de los componentes orgánicos (materias primas) y el cumplimiento de la normatividad por el Ministerio de Agricultura (Santos *et al.*, 2014). Sobre estos aspectos, el compost obtenido cumple con lo establecido a contaminantes biológicos, ya que fue inferior al límite permitido, de esta manera faculta su utilización como abono para la producción agrícola. De igual forma, los resultados de producción de lechuga en el sistema hidropónico abierto utilizando el compost como fuente de nutrientes, permite confirmar su uso como fertilizante, ya que el compost adicionado al sustrato de fibra de coco, fue capaz de producir la lechuga; pero en algunos aspectos de la producción de las plantas, no se presentaron diferencia estadística entre las dosis aplicadas. Estos resultados se deben al elevado coeficiente de variabilidad (Tab. 6 y 7), hecho que ocasionó la pérdida de sensibilidad en las pruebas utilizadas.

Las hortalizas tienen diferentes exigencias nutricionales y la toma de nutrientes difiere durante su crecimiento y desarrollo, por ejemplo plantas no frutíferas como la lechuga, presentan lenta absorción de nutrientes durante la primera mitad del ciclo de cultivo y se acelera cercano a la cosecha (Cardoso *et al.*, 2011). De esta forma, el aumento de los nutrientes en las plantas de lechuga, se vio favorecido a mayores dosis de compost, donde probablemente no se agotaron los nutrientes.

Por otro lado, el sistema hidropónico abierto empleado no circuló solución nutritiva y el compost fue la única fuente de nutrientes para el cultivo, pero el corto ciclo del cultivo de la lechuga (35 d) limitó la liberación de nutrientes presente en el compost. La combinación del compost con la solución nutritiva puede ser una alternativa para la utilización de este sistema de producción en un primer ciclo, para que permita una oferta de nutrientes sin perjudicar la producción del cultivo.

Diversos autores han constatado en sus investigaciones que el abonamiento con compost proporciona un aumento en el rendimiento de la lechuga (Oliveira *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2010; Nazareno *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011; Santana *et al.*, 2012). Además, la literatura sobre la utilización de compostajes orgánicos como fuente única de nutrición para la lechuga en sistema hidropónico es todavía escasa. Este trabajo presenta resultados que confirman esta alternativa viable y de gran importancia para retirar residuos orgánicos de basurales y rellenos sanitarios, donde no es el destino más adecuado.

## CONCLUSIONES

El compost producido a partir de residuos vegetales, orgánicos y estiércol bovino presenta las características físico-químicas y microbiológicas dentro de los estándares de utilización agronómica. El compost adicionado al sustrato de fibra de coco es capaz de favorecer la producción de plantas de lechuga. El ciclo de cultivo (35 d) no fue suficiente para la completa liberación de los nutrientes en el sistema de producción.

**Conflicto de intereses:** el manuscrito fue preparado y revisado con la participación de los autores, quienes declaran no tener algún conflicto de interés que coloquen en riesgo la validez de los resultados aquí presentados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albertin, R.M., E. Moraes, G.A. Neto, B.L.D. Angelis, E. Corveloni y F.F. Silva FF. 2010. Diagnóstico da gestão dos resíduos sólidos urbanos do município de Flórida Paraná. *Rev. Agro@ambiente* 4(2), 118-125. Doi: 10.18227/1982-8470ragro.v4i2.378
- APHA. 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater. Compendium of methods for the



- microbiological examination of foods. 22<sup>th</sup> ed. American Public Health Association, Washington DC, USA.
- Batista, W.D.R. y F.I.C. Vinhal. 2010. Compostagem doméstica: alternativa de aproveitamento de resíduos sólidos orgânicos. *Rev. Bras. Agroecol.* 5(2), 81-88.
- Boer, E.D., A. Jedrczak, Z. Kowalski, J. Kulczycka y R. Szpadt. 2010. A review of municipal solid waste composition and quantities in Poland. *Waste Manag.* 30(3), 369-377. Doi: 10.1016/j.wasman.2009.09.018
- Butu, A.W. y S.S. Mshelia. 2014. Municipal solid waste disposal and environmental issues in Kano metropolis, Nigéria. *Brit. J. Env. Sci.* 2(2), 10-26.
- Cardoso, A.I.L., K.P. Ferreira, R.M. Vieira Júnior y C. Alcarde. 2011. Alterações em propriedades do solo adubado com composto orgânico e efeito na qualidade das sementes de alface. *Hort. Bras.* 29(4), 594-599. Doi: 10.1590/S0102-05362011000400025
- Carmo Filho, F. y O.F. Oliveira. 1995. Mossoró: um município do semi-árido nordestino, caracterização climática e aspecto florístico. Coleção Mossoroense, série B. ESAM, Mossoró, Brasil.
- Cotta, J.A.O., N.L.C. Carvalho, T.S. Brum y M.O.O. Rezende. 2015. Compostagem versus vermicompostagem: comparação das técnicas utilizando resíduos vegetais, esterco bovino e serragem. *Eng. Sanit. Ambient.* 20(1), 65-78. Doi: 10.1590/S1413-41522015020000111864
- Dores-Silva, P.R., M.D. Landgraf y M.O.O. Rezende. 2013. Processo de estabilização de resíduos orgânicos: vermicompostagem versus compostagem. *Quím. Nova* 36(5), 640-645. Doi: 10.1590/S0100-40422013000500005
- Embrapa. 2009. Manual de análises químicas de solo, plantas e fertilizantes. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, Brasil.
- Figueiredo, P.G. y F.Y. Tanamati. 2010. Adubação orgânica e contaminação ambiental. *Rev. Verde Agroecol. Desenv. Sustent.* 5(3), 1-4.
- Gouveia, N. 2012. Resíduos sólidos urbanos: impactos socioambientais e perspectiva de manejo sustentável com inclusão social. *Ciênc. Saúde Coletiva* 17, 1503-1510. Doi: 10.1590/S1413-81232012000600014
- INMET (Instituto Nacional de Meteorologia). 2016. En: <http://www.inmet.gov.br/portal/>; consulta: enero de 2016.
- Kiehl, E.J. 2002. Manual de compostagem: maturação e qualidade do composto. 3<sup>a</sup> ed. Piracicaba, Brasil.
- Kumar, S., S.R. Sith, G. Fowle, R.C. Velis, J. Kumar, S. Arya, R. Kumar y C. Cheeseman. 2017. Challenges and opportunities associated with waste management in India. *Royal Soc. Open Sci.* 4(3), 1-11. Doi: 10.1098/rsos.160764
- Lesteur, M., V. Bellon-Maurel, C. Gonzalez, E. Latrille, J.M. Roger, G. Junqua y J.P. Steyer. 2010. Alternative methods for determining anaerobic biodegradability: A review. *Process Biochem.* 45(4), 431-440. Doi: 10.1016/j.procbio.2009.11.018
- Li, Z., H. Lu, L. Ren y L. He. 2013. Experimental and modelling approaches for food waste composting. *Chemosphere* 93(7), 1247-1257. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.06.064
- Maragno, E.S., D.F. Trombin y E. Viana. 2007. O uso da serragem no processo de minicompostagem. *Eng. Sanit. Ambient.* 12(4), 355-360. Doi: 10.1590/S1413-41522007000400001
- Mees, J.B.R., S. Damasceno, M.A.V. Boas, A. Fazolo y S.C. Sampaio. 2009. Estabilização da biomassa de aguapé através da compostagem com águas residuárias de suínos e resíduos de frigorífico. *Semina: Ciênc. Agrár.* 30(3), 709-716.
- Montemurro, F., D. Ferri, F. Tittarelli, S. Canali y C. Vitti. 2010. Anaerobic digestate and on-farm compost application: effects on lettuce (*Lactuca sativa* L.) crop production and soil properties. *Compost Sci. Util.* 18(3), 184-193. Doi: 10.1080/1065657X.2010.10736954
- Nazareno, G.G., A.M.R. Junqueira y J.R. Peixoto. 2010. Utilização de matéria orgânica para o controle de nematóides das galhas em alface sob cultivo protegido. *Biosci. J.* 26(4), 579-590.
- Oliveira, E.M., S.B. Queiroz y V.F. Silva. 2009. Influência da matéria orgânica sobre a cultura da alface. *Eng. Ambient.* 6(2), 285-292.
- Oliveira, E.Q., R.J. Souza, M.C.M. Cruz, V.B. Marques y A.C. França. 2010. Produtividade de alface e rúcula, em sistema consorciado, sob adubação orgânica e mineral. *Hort. Bras.* 28(1), 36-40. Doi: 10.1590/S0102-05362010000100007
- Ortiz, P.L.G., R.Q. Lizaola, V.E. Hernández, G.S.B. Valdés y M.J.S. Colín. 2012. Respiración de CO<sub>2</sub> como indicador de la actividad microbiana en abonos orgánicos de lupinus. *Terra Latinoam.* 30(4), 355-362.
- Pedrosa, T.D., C.A.S. Farias, R.A. Pereira y E.T.R. Farias. 2013. Monitoramento dos parâmetros físico-químicos na compostagem de resíduos agroindustriais. *Nativa* 1(1), 44-48. Doi: 10.14583/2318-7670.v01n01a08
- Pereira Neto, J.T. 2007. Manual de compostagem: processo de baixo custo. UFV, Viçosa-MG, Brasil.
- Rezende, J.H. 2013. Composição gravimétrica e peso específico dos resíduos sólidos urbanos em Jaú (SP). *Eng. Sanit. Ambient.* 18(1), 1-8. Doi: 10.1590/S1413-41522013000100001
- Santana, C.T.C., A. Santi, R. Dallacort, M.L. Santos y C.B. Menezes. 2012. Desempenho de cultivares de alface americana em resposta na diferentes doses de torta de filtro. *Rev. Ciênc. Agron.* 43(1), 22-29. Doi: 10.1590/S1806-66902012000100003

- Santos, C.S., N.S. Henrique, J.A. Shhlinder, E. Ferreira y R. Stachiw. 2014. Aproveitamento da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos para produção de composto orgânico. *Rev. Bras. Ciênc. Amaz.* 3(1), 15-28.
- Selle, G.L. 2007. Ciclagem de nutrientes em ecossistemas florestais. *Biosc. J.* 23(4), 29-39.
- Silva, E.M.N.C.P., R.L.F. Ferreira, S.E. Araújo Neto, L.B. Tavella y A.J.S. Solino. 2011. Qualidade de alface cresspa cultivada em sistema orgânico, convencional e hidropônico. *Hort. Bras.* 29(2), 242-245. Doi: 10.1590/S0102-05362011000200019
- Silva, F.A.M., F.G. Lopez, R.L. Villas Boas y R.B. Silva. 2009. Transformação da matéria orgânica em substâncias húmicas durante a compostagem de resíduos vegetais. *Rev. Bras. Agroecol.* 4(1), 59-66.
- Silva, I.R. y E.S. Mendonça. 2007. Matéria orgânica do solo. pp. 275-374. En: Novais, R.F., V.H. Alvarez, N.F. Barros, R.L.F. Fontes, R.B. Cantarutti y J.C.L. Neves (eds.). *Fertilidade do solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa-MG, Brasil.
- Srivastava, V., S.A. Ismail, P. Singh y R.P. Singh. 2015. Urban solid waste management in the developing world with emphasis on India: challenges and opportunities. *Rev. Env. Sci. Bio/Tec.* 14(2), 317-337. Doi: 10.1007/s11157-014-9352-4
- Valente, B.S., E.G. Xavier, T.B.G.A. Morselli, D.S. Jahnke, B.S. Brum Junior, B.R. Cabrera, P.O. Moraes y D.C.N. Lopes. 2009. Fatores que afetam o desenvolvimento da compostagem de resíduos orgânicos. *Arch. Zootec.* 58(1), 59-85.
- Yu, H. y G.H. Huang. 2009. Effects of sodium acetate as a pH control amendment on the composting of food waste. *Bioresour. Technol.* 100(6), 2005-2011. Doi: 10.1016/j.biortech.2008.10.007

# Rice husk substrates and pruning time for gypsophila production

## Sustratos de cascarilla de arroz y momento de la poda en la producción de gypsophila



DANIELA HÖHN<sup>1, 4</sup>  
ROBERTA MARINS NOGUEIRA PEIL<sup>1, 2</sup>  
LAIS PERIN<sup>1</sup>  
PRISCILA MONALISA MARCHI<sup>1</sup>  
PAULO ROBERTO GROLLI<sup>1</sup>  
ALBERTINA RADTKE WIETH<sup>3</sup>

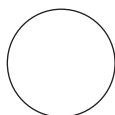
**Gypsophila production in gutters with leaching recirculation.**

Photo: D. Höhn

### ABSTRACT

This research evaluated the growth, yield and quality of gypsophila New Amore<sup>®</sup> variety grown in gutters filled with substrate in a system with leaching recirculation in southern Brazil. The treatments were the result of the combination of four substrates [carbonized rice husk (CRH100%), raw rice husk (RRH100%), CRH + organic commercial substrate S10 (Beifort<sup>®</sup>) (15%) and RRH+S10 (15%)] with two pruning times (early and late). The substrates did not affect the dry matter partitioning between the flowers and vegetative organs or the balance between the shoot and root growth. However, RRH100% reduced the shoot growth, flower stem yield and quality. The CRH100% and RRH+S10 substrates can be indicated for gypsophila cultivation once, in a general way, they presented promising results. The late pruning increased the gypsophila growth and yield and benefited the quality of the stems. The gypsophila plants adapted well to the employed crop system.

**Additional key words:** flower stems, yield, fertirrigation, alternative production systems, leaching recirculation.



<sup>1</sup> Capão do Leão, Federal University of Pelotas (UFPEL), Rio Grande do Sul-RS (Brazil). ORCID Höhn, D.: 0000-0001-7280-046X; ORCID Peil, R.M.N.: 0000-0002-4855-3638; ORCID Perin, L.: 0000-0003-4886-9664; ORCID Marchi, P.M.: 0000-0001-7505-1142; ORCID Grolli, P.R.: 0000-0002-5695-9072

<sup>2</sup> CNPq (Brazilian National Research Council), Researcher.

<sup>3</sup> Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul-RS (Brazil). ORCID Wieth, A.R.: 0000-0002-4401-8603

<sup>4</sup> Corresponding author. [dani.hohn.sc@gmail.com](mailto:dani.hohn.sc@gmail.com)



## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el crecimiento, productividad y calidad de gypsophila variedad New Amore®, cultivada en canales rellenos con sustratos y sistema con recirculación de la solución nutritiva en el sur de Brazil. Los tratamientos fueron el resultado de la combinación de cuatro sustratos [cascarilla de arroz carbonizada (CAC100%), cascarilla de arroz cruda (CACr100%), CAC + sustrato comercial orgánico S10 (Beifort®) (15%) y CACr+S10 (15%)] y dos épocas de poda (precoz y tardía). Los sustratos no afectaron la distribución de la materia seca entre las flores y los órganos vegetativos, así como el balance entre el crecimiento de la parte aérea y de las raíces. Sin embargo, el cultivo en el sustrato CACr100% redujo el crecimiento de la parte aérea, la producción y la calidad de los tallos florales. Los sustratos CAC100% y CACr+S10 pueden ser indicados para el cultivo de gypsophila debido a los buenos resultados obtenidos. La poda tardía aumentó el crecimiento, la productividad y mejoró la calidad de los tallos florales de gypsophila. Se concluye que las plantas de gypsophila se adaptaron bien al sistema de cultivo con recirculación de la solución nutritiva.

**Palabras clave adicionales:** tallos florales, productividad, fertirriego, sistemas alternativos de producción, recirculación de la solución.

Received for publication: 21-03-2018 Accepted for publication: 30-05-2018

## INTRODUCTION

*Gypsophila paniculata*, popularly known as baby's-breath, is widely used in floral arrangements and bouquets, cultivated as an annual cut flower (Petty, 2008). *Gypsophila* has a reduced life cycle because of its susceptibility to soil pathogens (Wahome *et al.*, 2011). Cultivation in a substrate, beyond avoiding pathogens, may allow *Gypsophila* production in areas where its cultivation is difficult or impractical.

Among the materials used as the substrate component for ornamental plants cultivation, carbonized rice husks present some positive characteristics, such as high porosity, allowing drainage and aeration, good sanitary aspects (Ferreira *et al.*, 2008), low cost and easy acquisition (Da Costa *et al.*, 2017). However, there are some drawbacks in the carbonization process since it is onerous, presents low efficiency and causes air pollution.

In this sense, raw rice husks can be an alternative substrate in nutrient solution recirculation systems ("closed systems"). In this system, the high leaching of the nutrient solution as a result of the low water holding capacity of raw rice husks does not represent an environmental problem because of the leach reuse (Peil *et al.*, 2014).

Flower cultivation in substrates with leaching recirculation may be a promising crop growing system

because it saves water and fertilizer and presents less of an environmental impact. However, the use of closed systems requires a proper substrate. The high proportion of organic compound in the mixture means a high CEC, making impossible to adopt this practice because of the tendency towards salinization. On the other hand, the absence of organic compounds in rice husk mixtures can lead to water deficit problems because of the resulting low water holding capacity (Steffen *et al.*, 2010).

Besides the aspects related to the cultivation system, crop management is another fundamental element for determining plant yield and quality. The apical pruning of *Gypsophila* plants ("pinching") consists of eliminating their apex in the first productive cycle in order to break the apical dominance and increase yield (Dorajeero and Mokashi, 2013). Late pruning could benefit the initial establishment of the crop, with positive effects on plant growth and final yield of stems.

Studies focusing on the substrate in closed growing systems and the pruning time are still non-existent for *Gypsophila*. Thus, the goal of this research was to verify the adaptation of *Gypsophila* crops to gutters filled with substrate in a system with leaching recirculation. The effects of rice husk-based substrates and

two pruning times (early and late) on plant growth and flower stem quality and yield were considered.

## MATERIAL AND METHODS

The trial was conducted in a plastic greenhouse (10×18 m) at the Capão do Leão-RS from October 7<sup>th</sup>, 2015 to April 4<sup>th</sup>, 2016. The approximate geographic location is 31°52' S and 52°21' W at an altitude of 13 m. The air temperature was monitored with a digital thermo-hygrometer installed in a meteorological shelter. The mean medium, maximum and minimum temperatures were, respectively, 24.1°C, 29.8°C and 18.5°C.

The New Amore<sup>®</sup> variety was used and the transplant was carried out on October 7<sup>th</sup>, 2015, when the commercial seedlings were about 4 to 5 cm high.

The cultivation system consisted of 12 wooden gutters (3.50 m long and 0.20 m wide), arranged in six double rows sloping 3%. The pairs of double rows were 0.80 m apart (0.60 m wide paths) with a 0.25 m between-row distance. The gutters were internally waterproofed with a white polyethylene film in order to collect and return the drain solution to a 100 L catchment tank placed at the final part of each gutter, forming a closed system. The substrates were arranged directly in the gutters with a 0.15 m high layer, corresponding to a volume of 105 L/gutter, which resulted in 5.8 L/plant, approximately.

A low-power washing machine pump was installed in each catchment tank. Fertirrigation was performed using drip tapes with a spacing of 0.20 m and an approximate flow rate of 8.0 L h<sup>-1</sup>. The nutrient solution was supplied intermittently, with a 15 min supply every hour, from 7 am to 7 pm.

The formulation of the nutrient solution followed the recommendation of Sonneveld and Straver (1994), whose composition of macronutrients was (in mmol L<sup>-1</sup>): 15.0 of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; 1.7 of H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>; 1.5 of SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>; 1.2 of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; 7.0 of K<sup>+</sup>; 4.5 of Ca<sup>2+</sup>; 1.2 of Mg<sup>2+</sup>; and micronutrients (in mg L<sup>-1</sup>): 1.40 of Fe; 0.6 of Mn; 0.30 of Zn; 0.30 of B; 0.05 of Cu and 0.05 of Mo. The electrical conductivity (EC) was maintained between 1.7 and 1.9 dS m<sup>-1</sup> and the pH between 5.5 and 6.5.

Four substrates were used: carbonized rice husk (CRH100%) and raw rice husks (RRH100%), used alone, and mixtures with CRH (85%) + commercial organic compound S10<sup>®</sup> (Beifort, Garibaldi-RS, Brazil) (15%) or RRH (85%) + S10<sup>®</sup> (15%). The commercial organic compound S10<sup>®</sup> originates from the composting of grape stalks and marc. The physical and chemical characteristics of the substrates were determined in the laboratory (Tab. 1).

Spacing the plants at 0.20 m in the within-row distance provided a plant density of 10.8 plants/m<sup>2</sup>, totaling 18 plants per gutter and 216 plants in total. At 21 days after setting (das), apical pruning was carried out in half of the plants of each gutter. The

**Table 1. Physical and chemical characteristics of the substrates carbonized rice husk (CRH) and raw rice husk (RRH), used alone and in mixture with the commercial S10 organic compound (Beifort<sup>®</sup>) at a 15% ratio, for the cultivation of *Gypsophila paniculata* in gutters with leaching recirculation.**

Physical characteristics	Substrates			
	CRH	RRH	CRH+S10	RRH+S10
Wet density (g L <sup>-1</sup> )	262	236	343	417
Dry matter (g/100 g)	60	38	54	54
Dry density (g L <sup>-1</sup> )	156	90	186	225
Total porosity (m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> )	0.77	0.72	0.74	0.76
Aeration space (m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> )	0.56	0.58	0.47	0.42
Water easily available (m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> )	0.12	0.04	0.12	0.12
Water holding capacity in 10 cm (m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> )	0.20	0.14	0.27	0.35
Chemical characteristics				
Electrical conductivity (dS m <sup>-1</sup> )	0.11	0.07	0.26	0.51
pH value (H <sub>2</sub> O)	5.06	5.29	5.00	4.69



primary stem apex was removed. In the remaining plants, pruning was performed at 42 das. Thus, two pruning times were established, early and late pruning, respectively.

A randomized block experiment design with subdivided plots and three replications was used. The substrate was allocated in the plot (corresponding to a gutter with 18 plants) and pruning time in the subplot (9 plants).

The harvest started at 88 das, on January 5<sup>th</sup>, 2016, and ended at 96 das in the first productive cycle. The second productive cycle started at 171 das, on March 27<sup>th</sup>, 2016, and ended at 180 das. Flower stems longer than 50 cm were collected when about 30% open flower buds was presented.

Four plants per subplot were selected for the evaluation of the following variables:

(a) Productivity variables: the number and the fresh weight of the productive flower stems were evaluated. With these data, the flower stem average weight, the yield and the number of packs (300 g) harvested per square meter were calculated.

(b) Quality variables: the following variables were evaluated: stem length (cm) and diameter (mm; obtained by measuring the flower stems base with a pachymeter) and the number of side branches (branches more than 10 cm long originating from the main axis of each productive flower stem were counted).

(c) Plant dry matter: the productive flower stems were separated into vegetative and flowers fractions. At the end of the experiment, the remains of the crop were collected. The roots were separated from the substrate with washing using low pressure running water. The different fractions were dried in an oven at 65°C until constant weight to obtain the dry matter (DM). The shoot dry matter partitioning was calculated for each productive cycle. The sum of the two productive cycle shoot organ DM production and the root DM obtained at the end of the experiment were considered in order to determine the shoot/root DM ratio.

The data were submitted to analysis of variance and comparison of means with Tukey's test at 5 % probability.

## RESULTS AND DISCUSSION

The interaction between the substrate and pruning time was not significant for any of the evaluated variables. Therefore, the results were interpreted separately for each experiment factor (Tab. 2, 3 and 4).

For the effect of the substrates on the plant shoot growth (Tab. 2), CRH+S10 promoted a higher shoot DM production, but it did not differ significantly from RRH+S10 and CRH100%. The substrate RRH100% presented lower results than CRH+S10.

In the first productive cycle, the use of CRH+S10 increased the vegetative and the total shoot DM production, as compared to the substrate RRH100%. In the second productive cycle, CRH100% promoted higher values of vegetative and total shoot DM production in comparison to RRH100%. The addition of S10 to RRH did not show significant positive effects on any of the growth variables analyzed in both productive cycles. However, although there were no significant differences between CRH100% and CRH+S10 in relation to the vegetative and flower DM, as a result of the highest values for both variables, the CRH+S10 combination increased the DM production of the shoot in the first cycle. However, it had no effects in the second cycle. No significant effects from the substrates on the flower DM production and DM partitioning between the different organs of the shoot in both productive cycles were observed (Tab. 2).

For the pruning time, the results showed that, in both productive cycles, the late pruning provided a higher DM production of flowers (Tab. 2). Since the vegetative DM production was not affected, the late pruning increased the DM partitioning to the flowers (20.3 and 18.8%) in comparison to the early pruning (12.9 and 14.5%) in the first and second cycles, respectively. These results indicate that the late pruning promoted a greater proportion of flowers in the shoot, which is primordial from the ornamental point of view.

On average, the flowers comprised only 16.7% of the total shoot DM production, which demonstrated that they are low sinks for assimilates, regardless of the analyzed treatment.

With respect to the variables related to root growth (Tab. 3), the only observed difference was the higher root DM production of the plants cultivated in

**Table 2. Effect of substrate and pruning time on the dry matter production and partitioning between vegetative plant organs and flowers of *Gypsophila paniculata* cultivated in gutters with leaching recirculation.**

Effect	Dry matter production (g/plant)			Dry matter partitioning (%)	
	Vegetative	Flowers	Shoot	Vegetative	Flowers
	<b>First productive cycle</b>				
Substrate					
CRH	53.0 ab	10.5 a	64.0 b	82.9 a	17.1 a
RRH	43.5 b	9.0 a	52.5 b	82.5 a	17.5 a
CRH+S10	68.0 a	13.0 a	81.5 a	83.4 a	16.6 a
RRH+S10	57.0 ab	11.2 a	68.2 ab	83.7 a	16.3 a
Pruning					
Early (21 das)	54.9 a	7.7 b	62.9 a	87.1 a	12.9 b
Late (42 das)	55.8 a	14.1 a	70.6 a	79.7 b	20.3 a
CV %	19.32	26.66	19.87	3.09	15.74
	<b>Second productive cycle</b>				
Substrate					
CRH	43.3 a	8.8 a	52.1 a	83.2 a	16.8 a
RRH	32.2 b	6.7 a	38.9 b	82.8 a	17.2 a
CRH+S10	40.2 ab	7.8 a	48.0 ab	83.7 a	16.3 a
RRH+S10	39.8 ab	7.7 a	47.5 ab	83.8 a	16.2 a
Pruning					
Early	37.3 a	6.0 b	43.3 b	85.5 a	14.5 b
Late	40.7 a	9.5 a	50.5 a	81.2 b	18.8 a
CV %	14.9	24.61	15.4	3.46	17.4

CRH: carbonized rice husk; RRH: raw rice husk; S10: comercial organic compound (Beifort®) at the ratio of 15% in the substrate mixture.

Means followed by the same letter in the column, for each factor and productive cycle, do not differ significantly according to the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ).

RRH+S10, as compared to the RRH100% substrate. Despite this difference, the substrates had no effect on the shoot/root DM ratio. Thus, we can say that the plants cultivated in the four substrates showed a proper balance between root activity (water and nutrient uptake) and shoot activity (photosynthesis). The pruning time did not have a significant effect on the root DM production or the shoot/root DM ratio (Tab. 3).

The substrates had no significant effect on the variables related to the quality of the flower stems in the first cycle (Tab. 4). In the second cycle, the cultivation in CRH+S10 increased the plant stems diameter, as compared to RRH100% (Tab. 4). However, no effect of substrates was observed on the flower stem length and number of side branches per stem.

For the productivity variables in the first cycle, the CRH+S10 substrate increased the flower stem average weight in relation to the cultivation in both

**Table 3. Effect of substrate and pruning time on the root dry matter production and the ratio of shoot/root dry matter of *Gypsophila paniculata* cultivated in gutters with leaching recirculation.**

	Dry matter of roots (g/plant)	Shoot-root ratio (g g <sup>-1</sup> )
<b>Substrate</b>		
CRH	8.3 ab	14.6 a
RRH	6.0 b	15.8 a
CRH+S10	7.5 ab	18.2 a
RRH+S10	8.7 a	14.2 a
<b>Pruning</b>		
Early (21 das)	7.6 a	14.6 a
Late (42 das)	7.7 a	16.8 a
CV%	18.2	20.9

CRH: carbonized rice husk; RRH: raw rice husk; S10: comercial organic compound (Beifort®) at the ratio of 15% in the substrate mixture.

Means followed by the same letter in the column, for each factor, do not differ significantly according to the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ).

**Table 4. Effect of substrate and pruning time on the flower stem quality and productivity responses of *Gypsophila paniculata* cultivated in gutters with leaching recirculation.**

	Quality Variables			Productivity			
	Stem diameter (mm)	Stem length (cm)	N° of side branches/stem	Stem average weight (g)	N° of stems (m <sup>2</sup> )	Stem yield (g m <sup>2</sup> )	N° of packs (m <sup>2</sup> )
First productive cycle							
<b>Substrate</b>							
CRH	4.6 a	89.5 a	9.1 a	24.3 b	103.5 a	2,418.0 ab	8.0 ab
RRH	4.5 a	87.3 a	9.3 a	23.4 b	90.4 a	1,906.3 b	6.4 b
CRH+S10	4.6 a	93.4 a	9.7 a	34.55 a	93.6 a	3,076.1 a	10.2 a
RRH+S10	4.7 a	89.7 a	9.6 a	28.6 ab	91.8 a	2,528.0 ab	8.5 ab
<b>Pruning</b>							
Early	5.0 a	86.6 b	10.3 a	32.7 a	73.3 b	2,372.7 a	7.9 a
Late	4.2 b	93.4 a	8.6 b	22.7 b	116.3 a	2,596.7 a	8.6 a
CV %	5.72	5.25	5.38	21.3	12.94	16.78	16.78
Second productive cycle							
<b>Substrate</b>							
CRH	4.7 ab	79.6 a	11.8 a	27.2 a	68.4 a	1,851.5 a	6.2 a
RRH	4.5 b	80.7 a	11.3 a	27.8 a	50.4 b	1,379.4 a	4.6 a
CRH+S10	5.0 a	82.9 a	11.9 a	31.7 a	63.0 a	1,995.1 a	6.6 a
RRH+S10	4.6 b	81.5 a	11.5 a	27.7 a	65.7 a	1,816.1 a	6.0 a
<b>Pruning</b>							
Early	4.6 a	81.2 a	11.7 a	27.0 a	58.9 a	1,570.0 b	5.2 b
Late	4.8 a	81.1 a	11.6 a	30.1 a	64.8 a	1,950.9 a	6.4 a
CV %	4.1	3.61	5.82	18.26	12.12	22.48	22.48
Total: 1 <sup>st</sup> + 2 <sup>nd</sup> cycle							
<b>Substrate</b>							
CRH100%				31.4 a	171.9 a	4,269.4 ab	14.3 ab
RRH100%				51.18 a	140.8 b	3,285.7 b	10.9 b
CRH+S10				66.2 a	156.6 ab	5,071.2 a	16.8 a
RRH+S10				56.4 a	157.5 ab	4,354.6 ab	14.5 ab
<b>Pruning</b>							
Early				59.7 a	132.3 b	3,942.9 a	13.2 a
Late				52.8 a	181.1 a	4,547.6 a	15.14 a
CV %				17.05	9.22	17.14	17.2

CRH: carbonized rice husk; RRH: raw rice husk; S10: comercial organic compound (Beifort®) at the ratio of 15% in the substrate mixture.

Means followed by the same letter in the column, for each factor and cycle, do not differ significantly according to the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ).

RRH100% and CRH100%. It also increased the yield of flower stems and the number of packs harvested per square meter in comparison with RRH100% (Tab. 4). In the second productive cycle, the only difference was in the lowest number of stems/m<sup>2</sup>, obtained

from the plants cultivated in CRH100% (Tab. 4). Thus, the effects of the addition of compound S10 to improve the productivity responses to the use of pure materials were barely perceptible in both CRH and RRH. The S10 addition only increased the average

weight of the flower stems in relation to the use of CRH100% in the first cycle and increased the number of flower stems harvested per m<sup>2</sup> in relation to RRH100% in the second cycle.

For the sum of the two productive cycles, the CRH+S10 mixture continued to show better results than RRH100% with respect to the flower stem yield and the number of packs/m<sup>2</sup>.

It should be pointed out that, when RRH 100% was compared to the CRH100%, the first one did not affect negatively any of the quality variables. It presented a negative effect only in terms of the number of stems/m<sup>2</sup> in the second productive cycle, which remained in the sum of the two cycles (Tab. 4).

The effects of the substrate on the productive variables were more incipient in the second productive cycle than in the first one. Possibly, this can be attributed to the increase in the water holding capacity (WHC) and the higher adsorption of nutrient ions caused by the natural decomposition of the material over time.

The results obtained can be explained according to the characteristics of the substrates (Tab. 1). The addition of S10 at the ratio of 15% conferred benefits to some of the physical and chemical characteristics of the mixtures as compared to the use of pure materials, especially in RRH.

The RRH, when employed alone, led to some inferior responses in comparison with the other substrates. This fact can be attributed to the low WHC (Tab. 1), which results in difficulty in the conservation of a homogeneous moisture, indicating that it should be used in mixture with other materials in order to obtain greater efficiency. Medeiros *et al.* (2008) highlighted the trend for lower productivity with RRH, evaluating strawberry cultivation in different rice husk substrates. The low WC of the RRH would negatively influence the yield of the crop because it would hinder the absorption of water and nutrients to the plants.

The addition of S10 considerably increased the wet density of RRH and CRH (Tab. 1). The dry matter content of the substrate increased in the RRH+S10 mixture and decreased in CRH+S10. However, the total porosity did not change in either substrate. The addition of S10 caused a reduction in the aeration space of the substrates, which was lower in

CRH (9%) than in RRH (16%). This led to aeration levels in the range that is considered ideal for horticultural substrates. However, this did not change the easily available water in CRH+S10, but increased it in RRH+S10. The WHC of the mixtures increased considerably when compared to the pure materials, especially in RRH+S10 (Tab. 1).

The physical changes observed in the substrates caused by the addition of S10 were related to the rearrangement of the particles with the introduction of the material formed by smaller particles (S10), which was more evident in RRH, whose particles have a more uniform size. The carbonization process broke part of the rice husks, which generated greater variation in the particle size distribution in CRH, with a percentage that was similar to the particle size in S10. Thus, the addition of the S10 conditioner affected the physical properties of the CRH less after mixing than RRH.

The addition of S10 increased the EC in the mixtures relative to the pure materials, which was more evident in RRH (Tab. 1). Possibly, S10 released ions in the substrate solution when irrigated with water alone, causing an increase in the EC before plant setting of 0.15 and 0.29 dS m<sup>-1</sup>, respectively, in CRH+S10 and RRH+S10, as compared to the pure materials.

For the pH values, the addition of S10 to RRH reduced this value, but it did not cause a significant change in the pH of the CRH+S10 as compared to CRH100%. This reduction can be attributed to the presence of S10 microorganisms in combination with the RRH microorganisms, which would influence the substrate composition and, consequently, pH. In this experiment, the lower pH observed in RRH+S10 before the plant cultivation was not detrimental since the corrections made with sodium hydroxide throughout the growing period increased the pH values and, consequently, the availability of adequate nutrients to the development of the crop.

Thus, changes in the physical and chemical characteristics were more evident with the addition of S10 to RRH than to CRH, indicating an increase in the availability of water and nutrient content, which could explain the improvement of plant responses in the RRH+S10 mixture over RRH100%.

So, RRH+S10, CRH100% and CRH+S10 presented better results. However, the RRH100% negative responses were not constant for all of the variables.

Thus, it is not possible to highlight a substrate with clearly superior responses. But, RRH100% may be considered as less promising substrate for this crop considering the management adopted in this research. In any case, the growth, production and quality responses were quite positive in relation to what is normally observed for gypsophila. Thus, before discarding RRH100% as a substrate, further research should be performed to verify fertirrigation management for gypsophila cultivation in this material.

The productivity of this crop is mainly related to the number of flower stems and the number of packs of 300 g (Ibraflor, 2016) produced per square meter. The average production obtained in this experiment, taking account the production from the two cycles, was 156.7 stems/m<sup>2</sup> and 14.1 packs/m<sup>2</sup>, which are well above the total values of 113.2 stems/m<sup>2</sup> and 4.9 packs/m<sup>2</sup> obtained by Girardi *et al.* (2012) for bottled gypsophila.

The positive results can be attributed to the high fertirrigation frequency used, which favored the plant growth, productivity and quality of the gypsophila. Thus, it was possible to verify that the system provided excellent responses of the plants regardless of the substrate. Researchers point out that the high nutrient solution supply in substrate cultivation increases the productivity and quality of different crops by providing plants with adequate amounts of water and mineral nutrients (Andriolo *et al.*, 2009; Pires, 2009).

Therefore, the use of CRH alone or RRH+S10 can be indicated because of the good responses associated with the lower cost of the first and the ease of preparation of the second. In this analysis, it should be taken into account that CRH is a low cost material, but difficult to obtain because of the carbonization process. On the other hand, the compound S10 has a higher cost, but its proportion was low in the mixture with RRH, which presents low cost in the southern region of Brazil.

For the pruning time effects in the first productive cycle (Tab. 4), the late pruning contributed to the production of longer stems, while the early pruning provided a larger diameter and number of side branches per stem. In addition, the late pruning increased the number of stems produced to 116.3 stems/m<sup>2</sup>, while, in the early pruning, this number was 73.3 stems/m<sup>2</sup>. In contrast, the early pruning increased the average weight of flower stems. Thus, in the final calculation,

the flower stem yield by weight (g m<sup>-2</sup>) and number of packs harvested per square meter were not affected by the pruning in this productive cycle.

In the second productive cycle, the late pruning increased the flower stem yield and the number of packs harvested per square meter. However, no pruning effect was observed on the other productivity and quality variables (Tab. 4).

The first cycle provided more elongated stems (mean of 90.0 cm) than the second one (mean of 81.2 cm). According to Ibraflor (2016), 50 cm is the minimum length of marketable flower stems; longer stems are more valued. Regardless of the pruning time and the productive cycle, the flower stems obtained from all of the treatments met the long stem market standards required by florists.

Uniformity in the flower stem thickness between the two cycles was observed (stem diameter averages of 4.6 and 4.7 mm, respectively, in first and second cycles). Uniformity in stem thickness contributes to the standardization of packs for markets, benefiting the quality of the final product (Ibraflor, 2016).

The analysis of the sum of the two cycles indicated that the positive effect of the late pruning was only observed in the number of stems/m<sup>2</sup> (Tab. 4).

Since, for quality attributes for markets, length is more important than the diameter of flower stems, the joint analysis of the quality variables with the productivity results indicates that late pruning was more suitable for this crop. This can be attributed to plants presenting a higher number of buds at the time of the late pruning. This led to a larger number of flower stems and longer ones in the first cycle; the latter characteristic is attributable to competition for light. The plants that were pruned earlier had fewer buds, which resulted in a lower number of stems. However, the stems had a higher average weight and diameter because of the lower light competition in the first cycle. In the second cycle, the differences between the pruning times were reduced. However, the late pruning still resulted in the harvesting of more packs and a higher yield.

Generally speaking, the growth (Tab. 2) and productivity responses (Tab. 4), as well as the length of the flower stems (Tab. 4), were lower in the second productive cycle. In the first productive cycle, the plant growth occurred in the spring. The mild temperatures



and the increased availability of solar radiation, typical of this season in Rio Grande do Sul State, promoted the plant growth and production of harvested stems. In the second cycle, the growth occurred from mid-January to April, when the very high temperatures in the first months and the decline in solar radiation, characteristic of the summer-autumn period, reduced plant growth and production.

## CONCLUSIONS

The 100% raw rice husk substrate resulted in lower plant growth, flower stem production and quality. However, the rice husk-based substrates did not affect the dry matter partitioning between flowers and vegetative organs or the balance between the shoot and root growth. The substrates with 100% carbonized rice husks and the mixture of raw rice husks (85%) + compound S10 (15%) may be indicated for the cultivation of gypsophila in a closed system.

The late pruning increased the growth and productivity of the gypsophila, benefiting the flower stem quality with regard to length.

The gypsophila crop adapted well to the cultivation in gutters filled with rice husk-based substrates in a leaching recirculation system.

**Conflict of interests:** the manuscript was prepared and reviewed with the participation of the authors, who declare that there exists no conflict of interest that puts the validity of the presented results at risk.

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Andriolo, J.L., D.I. Jänisch, C.S. Oliveira, C. Cocco, O.J. Schmitt, and F.L. Cardoso. 2009. Cultivo sem solo do morangueiro com três métodos de fertirrigação. *Ciênc. Rural* 39(3), 691-695. Doi: 10.1590/S0103-84782009005000009
- Da Costa, J.C.F., R.M.N. Mendonça, L.F. Fernandes, F.P. Oliveira, and D. Santos. 2017. Caracterização física de substratos orgânicos para o enraizamento de estacas de goiabeira. *Rev. Bras. Agropecu. Sustent.* 7(2), 16-23. Doi: 10.21206/rbas.v7i2.390
- Dorajearao, A.V.D. and A.N. Mokashi. 2013. Growth analysis as influenced by pinching time in garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* L.). *Global J. Bio-Sci. Biotechnol.* 2(1), 242-247.
- Ferreira, E.A., M. Pasqual, V. Mendonça, and N.F. Pires. 2008. Influencia de diferentes substratos e fertilizantes na aclimação de plantas de figueira (*Ficus Carica* L.). *Rev. Caatinga* 21(5), 64-68.
- Ibraflor (Instituto Brasileiro de Floricultura). 2016. Critério de classificação *Gypsophila paniculata*. In: <http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=163>; consulted: October, 2017.
- Girardi, L.B., M.X. Peiter, R.A. Bellé, F.A. Backes, F.S. Soares, and I. Valmorbidia. 2012. Disponibilidade hídrica e seus efeitos sobre o desenvolvimento radicular e a produção de *Gypsophila envasada* em ambiente protegido. *Irriga* 17, 501-509. Doi: 10.15809/irriga.2012v17n4p501
- Medeiros, C.A.B., A.S. Strassburger, and L.E.C. Antunes. 2008. Casca de arroz e sua carbonização para utilização em substratos. *Circular Técnica. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Brazil.*
- Peil, R.M.N., A.A.R. Albuquerque Neto, and C.V. Romaldi. 2014. Densidade de plantio e genótipos de tomateiro cereja em sistema fechado de cultivo em substrato. *Hort. Bras.* 32, 234-240. Doi: 10.1590/S0102-05362014000200021
- Petry, C., S. Bellé, and E.O. Calvete. 2008. Produção de gypsophila. pp. 172-178. In: Petry, C. (ed.). *Plantas ornamentais aspectos para a produção*. 2<sup>nd</sup> ed. Editora Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo-RS, Brazil.
- Pires, R.C.M., P.R. Furlani, R.V. Ribeiro, D.B. Junior, E. Sakai, A.L. Lourenção, and A.T. Neto. 2011. Irrigation frequency and substrate volume effects in the growth and yield of tomato plants under greenhouse conditions. *Sci. Agric.* 68(4), 400-405. Doi: 10.1590/S0103-90162011000400002
- Sonneveld, C. and N. Straver. 1994. *Nutrient solutions for vegetables and flowers grown in water or substrates*. 10<sup>th</sup> ed. Series Voeding Soplossingen Glastuinbouw. Proefstation voor Tuinbouw onder Glas, Naaldwijk, The Netherlands.
- Steffen, G.P.K., Z.I. Antiniolli, R.B. Steffen, and R.G. Machado. 2010. Cáscara de arroz y estiércol bovino como sustratos para la multiplicación de lombrices de tierra y la producción de plántulas de tomate y lechuga. *Acta Zool. Mex.* 26, 333-343.
- Wahome, P.K., T.O. Oseni, M.T. Masarirambi, and V.D. Shongwe. 2011. Effects of different hydroponics systems and growing media on the vegetative growth, yield and cut flower quality of gypsophila (*Gypsophila paniculata* L.). *World J. Agr. Sci.* 7(6), 692-698.

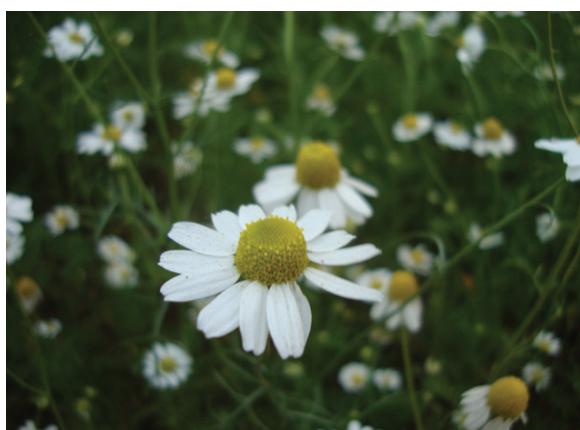
# Floral capitula and essential oil production analysis of chamomile (*Chamomilla recutita*) cultivars at different times of harvest

Análisis de la producción de capítulos florales y aceite esencial de cultivares de manzanilla (*Chamomilla recutita*) en diferentes épocas de cosecha

MILTON S. MATSUSHITA<sup>1,2</sup>  
CÍCERO DESCHAMPS<sup>1</sup>  
CIRINO CORRÊA JÚNIOR<sup>1</sup>  
MARÍLIA P. MACHADO<sup>1</sup>

**Floral capitula of chamomile.**

Photo: C. Corrêa Júnior



## ABSTRACT

Chamomile [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] belongs to the Asteraceae family and is part of a large medicinal plant group that is cultivated and used in Brazil and in the world. The objective of this study was to evaluate the floral capitula productivity and essential oil content and composition of four cultivars of chamomile in three harvesting periods. The experiment was conducted at the Canguiri Experimental Station (UFPR) from May 15<sup>th</sup> to September 9<sup>th</sup>, 2015. Four cultivars of chamomile were evaluated, from commercial products purchased in different countries: Twinings (England), Auchan (Spain), Lipton (Scotland) and Mandirituba (Brazil), which is traditionally grown in Paraná. The experiment design used randomized blocks in a 4×3 factorial scheme (4 cultivars and 3 harvesting periods), with four replicates. At 96 days after planting, manual harvests were performed, for a total of three harvests. After each harvest, the floral chapters were dried. The extraction of the essential oil and the identification of the chemical constituents of the essential oil were carried out in the Laboratory of Ecophysiology of UFPR. The harvest time affected the productivity of the floral capitula and essential oil, being higher in the first (276.9 and 0.71 kg ha<sup>-1</sup>, respectively) and third harvests (262.6 and 0.77 kg ha<sup>-1</sup>, respectively). The cultivars and harvests did not influence the essential oil percentage (0.22 to 0.29%) obtained from the floral capitula; however, they contributed to the definition of the produced chemical compound.

**Additional key words:** medicinal plant, productivity, chemical composition, genetic potential, harvest time.

<sup>1</sup> Instituto Emater, Universidade Federal do Parana, Curitiba-PR (Brazil). ORCID Matsushita, M.S.: 0000-0002-9970-2613; ORCID Deschamps, C.: 0000-0003-0786-0532; ORCID Corrêa Júnior, C.: 0000-0002-5234-4409; ORCID Machado, M.P.: 0000-0002-3209-4780

<sup>2</sup> Corresponding author. matsushita@emater.pr.gov.br

## RESUMEN

La manzanilla [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] pertenece a la familia Asteraceae y es parte de un gran grupo de plantas medicinales cultivadas y utilizadas en Brasil y en todo el mundo. El objetivo de este estudio fue evaluar la productividad de capítulos florales junto con el contenido y composición del aceite esencial de cuatro cultivares de manzanilla en tres períodos de cosecha. Se ha llevado a cabo el experimento en la Estación Experimental de Canguiri (UFPR) en el período del 15 de mayo hasta el 09 septiembre de 2015. Se evaluaron cuatro cultivares comerciales de manzanilla adquiridos en diferentes países: Twinings (Inglaterra), Auchan (España), Lipton (Escocia) y Mandirituba (Brasil), que tradicionalmente se cultivan en Paraná. El diseño experimental fue de bloques al azar a través de un factorial 4×3 (4 cultivares y 3 períodos de cosecha) y con cuatro repeticiones. A los 96 días tras la plantación se realizaron cosechas manuales, en un total de tres cosechas. Después de cada cosecha, se sometieron los capítulos a secado. La extracción de aceite esencial y la identificación de los componentes químicos del aceite esencial se realizaron en el Laboratorio de Ecofisiología de UFPR. La época de cosecha afectó la producción de capítulos y aceite esencial, siendo mayor en la primera (276,9 y 0,71 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente) y tercera cosechas (262,6 y 0,77 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente). Los cultivares y las cosechas no tuvieron influencia sobre el porcentaje de aceite esencial (0,22 a 0,29%) obtenido de los capítulos de las flores, pero contribuyen con la definición del compuesto químico a producirse.

**Palabras clave adicionales:** planta medicinal, productividad, composición química, potencial genético, momento de cosecha.

Received for publication: 14-11-2017 Accepted for publication: 30-05-2018

## INTRODUCTION

Chamomile [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert], belongs to the Asteraceae family and it is cultivated in many countries, including Brazil, with Paraná having the largest planted area (Corrêa Júnior *et al.*, 2008) with 3,000 ha, producing an average of US\$ 3.5 million per year (AEN-PR, 2016).

Chamomile is included in the pharmacopoeia of 26 countries (Salamon, 1992) and has more than 120 chemical constituents identified in the essential oil of its inflorescences (Pino *et al.*, 2002), including 28 terpenoids, 36 flavonoids and 52 compounds with potential pharmacological activity (Singh *et al.*, 2011). The essential oils of the different chamomile chemotypes presented the constituents cis- $\beta$ -Farnesene (0.9-65.9%), spathulenol (1.3-19.4%),  $\alpha$ -bisabolol B oxide (0.1-25.1%),  $\alpha$ -bisabololone A oxide (0.1-29.9%),  $\alpha$ -bisabolol (0.1-56.9%), camazulene (0.2-25.5%) and  $\alpha$ -bisabolol A oxide (0.1-55.9%) (Tadrent *et al.*, 2016).

The composition and percentage of the essential oil constituents of chamomile are subject to variations because of genetic and environmental factors

(Tadrent *et al.*, 2016). Research aimed at improving crop production technologies is important for increasing the production and quality of essential oil. Thus, the introduction of cultivars that adapt to regions of production can bring benefits to chamomile cultivation. The objective of this study was to evaluate the productivity of flower buds, the essential oil content and the composition of four cultivars of chamomile in three harvest periods.

## MATERIAL AND METHODS

This experiment was conducted at the Experimental Stations Center of Canguiri (UFPR) in the municipality of Pinhais-PR (25°23.258' S and 40°07.713' W, 919 m of altitude), where the climate is classified by the Köppen international system as humid mesothermal subtropical. In the period of the experiment (May 15<sup>th</sup> through September 9<sup>th</sup>, 2015), the total rainfall index was 404 mm, with an average temperature of 15.5°C, minimum of 6.0°C and maximum of 32.7°C (Simepar, 2015). The soil of the experimental area is classified as haplic cambisol (Embrapa, 1999). For the

chemical characteristic analysis, the soil was sampled at the depth of 0-20 cm in five points in the experimental area. The sample was analyzed according to Pavan *et al.* (1992) and presented: pH  $\text{CaCl}_2=6.0$ ;  $\text{Al}^{3+}=0.0 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{H}^++\text{Al}^{3+}=3.7 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{Ca}^{2+}=9.0 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{Mg}^{+2}=3.8 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{K}^+=0.9 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{P}=212 \text{ mg dm}^{-3}$ ;  $\text{C}=35.8 \text{ g dm}^{-3}$ ; base saturation of 79% and clay content of  $513 \text{ g kg}^{-1}$ .

Four cultivars of chamomile were evaluated from commercial products purchased in different countries: Twinings (England), Auchan (Spain), Lipton (Scotland), and Mandirituba (Brasil), cultivated in Parana.

The experiment design used randomized blocks in a  $4 \times 3$  factorial scheme (4 cultivars and 3 harvesting periods), with four repetitions. Each plot consisted of an area of  $2 \text{ m}^2$ , where 25 g of seeds were used, mixed with maize corn as a vehicle at a ratio of 50:1 by weight. Manual seeding and compaction were carried out directly in the plots, followed by manual weeding on two occasions during the vegetative cycle, which preceded the harvests.

At 96 d after planting, when 70% of the petals were horizontal, manual harvesting was performed every 11 d, totaling three crops. After each harvest, the floral chapters were dried in a dryer (Fanem, Mod. 320 SE; São Paulo-SP, Brazil) with air circulation, at a temperature of  $65^\circ\text{C}$  for 24 h. For the determination of the oil content on dry basis, 20 g subsamples were dried in a dryer at  $65^\circ\text{C}$  until constant mass.

The extraction of the essential oil was carried out with hydrodistillation for 4 h in a Clevenger type graded apparatus using 50 g of dried capitulas in 1 L of distilled water. The mixture of the essential oil and water vapors was separated with the density difference after condensation. After extraction, the samples were stored at  $-20^\circ\text{C}$ , where they remained until the time of analysis.

The chemical constituents of the essential oil were identified with gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC/MS). The chromatograph was the Varian model CP-3800, with a Saturn 2000 MS/MS detector (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA) and a fused silica column, 100 m in length (stationary phase PONA). Helium gas was used to lower the pressure to 49.5 psi. The initial temperature was  $120^\circ\text{C}$  for 22 min, which was then elevated to  $230^\circ\text{C}$  for 20 min with a heating rate of  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ . The 0.2

$\mu\text{L}$  of essential oil was injected with a 200 split ratio and injection temperature of  $200^\circ\text{C}$ . The identification of the chemical constituents was done by comparing the Nist 98 (Varian Inc.) library with the mass spectra obtained for each compound.

The data were submitted to the Bartlett test to verify the homogeneity of the variances and then to analysis of variance (ANOVA). The means were compared with the Tukey test at 5% probability, using the statistical program Assistat version 7.7 beta (Silva and Azevedo, 2006).

## RESULTS AND DISCUSSION

The chamomile cultivars did not present statistical differences in relation to the productivity of the floral capitula, obtaining productivity of 662.8 to  $808.3 \text{ kg ha}^{-1}$ . However, the harvest influenced the productivity of the floral capitula and yield of essential oil. Greater floral capitulum and essential oil yields were observed in the first and third harvests, respectively (Tab. 1). The results found in all cut periods were higher for the cultivar Mandirituba, when compared to the productivity of the chapters for the same cultivar obtained by Amaral *et al.* (2012),  $510.0 \text{ kg ha}^{-1}$ .

The cultivars and time of crops did not affect the percentage of essential oil. An average 0.29% of essential oil was obtained from the floral capitula in the cultivar Lipton, being only that Twinings in the third harvest presented the minimum level (0.40%) (Tab. 1) allowed by the Brazilian Pharmacopoeia (1996) for use as a plant drug. The Mandirituba cultivar presented an essential oil content of 0.47% when cultivated in the municipality of Piraquara (PR) (Amaral *et al.*, 2012). However, Corrêa Júnior (1995) obtained high levels of essential oil for the same cultivar (0.80%). This demonstrates that environmental factors must be related to the low levels of essential oil obtained in the present study for the Mandirituba cultivar. For the other cultivars, new research is needed to know the maximum potential of each one.

Schilcher (1973) and Motl *et al.* (1977) documented the large variation in the content of individual constituents that chamomile oil may present. Despite the differences between the authors, the results found in the present study are within the ranges described for the major constituents obtained in the essential oil of the four cultivars (Tab. 2).

**Table 1. Productivity of floral capitulas, essential oil content and yield of four chamomile cultivars in three harvest seasons. Curitiba, 2016.**

Cultivar	Floral capitulas (kg ha <sup>-1</sup> )				Mean <sup>ns</sup>
	1 <sup>st</sup> harvest	2 <sup>nd</sup> harvest	3 <sup>rd</sup> harvest	Amount	
Twinnings	314.8	181.2	263.7	759.7	253.2
Auchan	215.9	175.3	271.6	662.8	220.9
Lipton	250.3	182.8	247.1	680.2	226.7
Mandirituba	326.6	213.7	268.0	808.3	269.4
Mean**	276.9 a	188.2 b	262.6 a		
Cultivar	Essential oil (kg ha <sup>-1</sup> )				Mean <sup>ns</sup>
	1 <sup>st</sup> harvest	2 <sup>nd</sup> harvest	3 <sup>rd</sup> harvest	Amount	
Twinnings	0.72	0.39	0.52	1.63	0.54
Auchan	0.54	0.50	0.70	1.74	0.58
Lipton	0.68	0.33	0.95	1.96	0.65
Mandirituba	0.95	0.40	0.86	2.21	0.74
Mean**	0.71a	0.40b	0.77a		
Cultivar	Essential oil (%)				Mean <sup>ns</sup>
	1 <sup>st</sup> harvest	2 <sup>nd</sup> harvest	3 <sup>rd</sup> harvest	Mean <sup>ns</sup>	
Twinnings	0.24	0.21	0.20	0.22	
Auchan	0.23	0.28	0.26	0.25	
Lipton	0.28	0.18	0.40	0.29	
Mandirituba	0.28	0.19	0.32	0.26	
Mean <sup>ns</sup>	0.26	0.22	0.29		

Means followed by the same letter in the line do not differ statistically by the Tukey test ( $P \leq 0.01$ ).

<sup>ns</sup>: not significant; \*\*: significant at 1% probability by analysis of variance (ANOVA).

The compound (E)- $\beta$ -farnesene is a sesquiterpene hydrocarbon and was identified in the essential oil of the four evaluated cultivars, but with no significant difference between them. Only the harvest period was significant for this constituent, being highest in the third harvest (14.9%) (Tab. 2). Different chamomile cultivars in Egypt showed similar results for (E)- $\beta$ -farnesene (11.34-13.29%) (Hendawy *et al.*, 2015). An increase of the percentage of (E)- $\beta$ -farnesene was observed in all cultivars in the third harvest. This increase may have occurred because of an induction caused by some type of stress since (E)- $\beta$ -farnesene has a high potential for stress protection (Palmer-Young *et al.*, 2015). In *Pinus taeda*, for example, high luminosity and temperatures induce the emission of (E)- $\beta$ -farnesene (Helmig *et al.*, 2006), and, in corn, emission is induced by injuries caused by herbivores (Schmelz *et al.*, 2001), suggesting that (E)- $\beta$ -farnesene can mediate tolerance to biotic and abiotic stress.

The most important oxidation products of  $\alpha$ -bisabolol are  $\alpha$ -bisabolol A and B oxides. The anti-inflammatory and spasmolytic effects of  $\alpha$ -bisabolol oxides

are widely discussed in the literature (Bezerr *et al.*, 2009; Waleczek *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2005; McKay and Blumberg, 2006; Neuhaus-Carlisle *et al.*, 1997), demonstrating the importance of these constituents. The cultivars presented statistical differences for the  $\alpha$ -bisabolol A oxide and  $\alpha$ -bisabolol B oxide. Lipton presented the highest percentages for  $\alpha$ -bisabolol A oxide (27.2%) and  $\alpha$ -bisabolol B oxide (20.3%). On the other hand, the cultivar Twinnings presented a high percentage of  $\alpha$ -bisabolol A oxide (26.5%) and the lowest percentage of  $\alpha$ -bisabolol B oxide (9.9%). For all of the cultivars, the first harvest yielded a higher percentage of  $\alpha$ -bisabolol A oxide, and the harvesting season did not affect the amount of  $\alpha$ -bisabolol B oxide (Tab. 2). In chamomile cultivars grown in Egypt, Hendawy *et al.* (2015) obtained percentages of  $\alpha$ -bisabolol A oxide higher than those found in this study (44.68-53.93%).

Another important constituent of chamomile essential oil (Nogueira and Minetto, 2005) is camazulene because of its anti-inflammatory effect, which presented a variation of 3.2 to 4.0% in the three harvest periods; no statistical difference was observed among



**Table 2. Chemical constituents of *Chamomilla recutita* essential oil cultivars at three harvest times. Curitiba, 2016.**

Cultivar	(E)- $\beta$ -farnesene (%)			
	1 <sup>st</sup> harvest	2 <sup>nd</sup> harvest	3 <sup>rd</sup> harvest	Mean <sup>ns</sup>
Twinnings	8.7	14.3	15.9	13.0
Auchan	10.2	10.4	14.0	11.6
Lipton	11.1	11.8	13.9	12.3
Mandirituba	9.4	10.4	15.7	11.9
Mean**	9.9 c	11.7 b	14.9 a	
Cultivar	Dehydro-sesquiceneole (%)			Mean**
Twinnings	4.5	4.9	4.4	4.6 a
Auchan	2.1	2.8	2.5	2.5 c
Lipton	1.7	1.5	1.8	1.6 d
Mandirituba	3.0	3.7	3.4	3.4 b
Mean <sup>ns</sup>	2.8	3.2	3.0	
Cultivar	$\alpha$ -bisabolol A oxide (%)			Mean**
Twinnings	27.9	26.0	25.7	26.5 a
Auchan	25.4	24.1	22.7	24.1 b
Lipton	27.5	28.8	25.3	27.2 a
Mandirituba	24.7	23.8	23.7	24.1 b
Mean**	26.4 a	25.7 ab	24.4 b	
Cultivar	$\alpha$ -bisabolol B oxide (%)			Mean**
Twinnings	10.4	10.9	8.5	9.9 c
Auchan	20.3	20.6	19.6	20.1 a
Lipton	20.7	20.6	19.6	20.3 a
Mandirituba	17.7	17.2	13.6	16.2 b
Mean <sup>ns</sup>	17.3	17.3	15.3	
Cultivar	Epi- $\alpha$ -bisabolol (%)			Mean**
Twinnings	9.2	7.1	6.0	7.4 a
Auchan	8.4	8.2	6.4	7.7 a
Lipton	4.6	4.6	5.1	4.8 b
Mandirituba	6.8	6.9	6.2	6.6 ab
Mean <sup>ns</sup>	7.3	6.7	5.9	
Cultivar	Camazulene (%)			Mean <sup>ns</sup>
Twinnings	3.6	2.9	3.6	3.4
Auchan	3.8	3.4	4.0	3.7
Lipton	2.7	3.0	4.0	3.2
Mandirituba	3.3	3.4	4.7	3.8
Mean**	3.4 ab	3.2 b	4.0 a	
Cultivar	(Z)-Spiro-ether (%)			Mean <sup>ns</sup>
Twinnings	12.7	12.4	14.5	13.2
Auchan	9.5	13.6	12.4	11.8
Lipton	13.8	12.9	12.5	13.1
Mandirituba	13.8	14.1	12.9	13.6
Mean <sup>ns</sup>	12.5	13.3	13.1	12.9

Means followed by the same letter in the line do not differ statistically by the Tukey test ( $P \leq 0.01$ ).

<sup>ns</sup>: not significant; \*\*: significant at 1% probability by analysis of variance (ANOVA).

the cultivars (Tab. 2). In the third harvest period, the cultivar Mandirituba presented 4.7% camazulene, a similar result to that found for the same cultivar in the municipality of Piraquara-PR (Amaral *et al.*, 2012). Higher percentages of camazulene were obtained from essential oil extracted from chamomile in Iran (15.12%) (Amiri and Sharafzadeh, 2014) and in Cuba (14.1%) (Pino *et al.*, 2000). Khourgami *et al.* (2012) verified that plant density and nitrogen doses supplied to plants resulted in an increase of camazulene in chamomile essential oil. Recent research has also shown that it is possible to increase the percentage of camazulene extracted from the essential oil of chamomile by modifying its extraction method (Homami *et al.*, 2016).

The compound  $\alpha$ -bisabolol, an oxygenated sesquiterpene, was found in one of its isomeric forms, epi- $\alpha$ -bisabolol; the percentage of this constituent in the essential oil was only influenced by the cultivars. Twinings and Auchan presented the higher percentages of epi- $\alpha$ -bisabolol, 7.4 and 7.7%, respectively, in relation to the Lipton cultivar (4.8%) (Tab. 2).

Variations observed in the yield of the floral capitula, essential oil and percentage of major compounds were affected mainly by the harvesting periods, as reflected in the characteristics of the chamomile oil. This indicates that the development of harvesting technologies for chamomile cultures is important so that cultivars can express their full genetic potential with increased productivity and essential oil quality.

## CONCLUSION

The productivity of the chamomile capitula ranged from 188.2 to 276.9 kg ha<sup>-1</sup> among the three harvest seasons, and higher yields were found in the first and third harvests. The chamomile cultivars showed no statistical differences in the productivity of the capitula, obtaining productivity of 662.8 to 808.2 kg ha<sup>-1</sup>. The productivity of the cultivars exceeded the average productivity of Curitiba, which is 500.0 kg ha<sup>-1</sup>. The essential oil contents were not influenced by the harvest times or cultivars, varying from 0.22 to 0.29%. The essential oil productivity was significantly influenced by the harvest season, with the higher yields found in the first (0.71 kg ha<sup>-1</sup>) and third (0.77 kg ha<sup>-1</sup>) harvests.

The camazulene percentages in the essential oil were influenced by the different harvesting times, but

there was no influence from the cultivars. Among the constituents evaluated, only  $\alpha$ -bisabolol A was affected by the harvest time and cultivars.

The Mandirituba cultivar, used as a reference, showed higher productivity of the floral capitula and essential oil for the analyzed cultivars.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Postgraduate Program in Agronomy (Plant Production) of the Federal University of Parana for support in conducting experiments and analyzes and the Paranaense Institute of Technical Assistance and Rural Extension for the authorization of the postdoctoral internship of the first author.

**Conflict of interests:** the manuscript was prepared and reviewed with the participation of the authors, who declare that there exists no conflict of interest that puts the validity of the presented results at risk.

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Amaral, W., C. Deschamps, M.P. Machado, H.S. Koehler, A.P. Scheer, L. Cocco, and C. Yamamoto. 2012. Avaliação de germoplasma de camomila e densidade de semeadura na produção e composição do óleo essencial. *Hortic. Bras.* 30(2), 195-200. Doi: 10.1590/S0102-05362012000200003
- Amiri, S. and S. Sharafzadeh. 2014. Essential oil components of German chamomile cultivated in Firoozabad, Iran. *Orient. J. Chem.* 30(1), 365-367. Doi: 10.13005/ojc/300151
- Bezerra, S.B., L.K.A.M. Leal, N.A.P. Nogueira, and A.R. Campos. 2009. Bisabolol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: role of prostaglandins, nitric oxide, and K<sup>+</sup> ATP channels. *J. Medic. Food* 12, 1403-1406. Doi: 10.1089/jmf.2008.0290
- Corrêa Júnior, C. 1995. "Mandirituba": nova cultivar brasileira de camomila. *Hortic. Bras.* 13, 61.
- Corrêa Júnior, C., M.C. Scheffer, A.V. Borsato, and E. Dranka. 2008. O cultivo da camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert]. Instituto Emater, Curitiba, Brazil.
- Embrapa. 1999. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Embrapa-CNPQ, Rio de Janeiro, Brazil.
- Helmig, H., J. Ortega, A. Guenther, J.D. Herrick, and C. Geron. 2006. Sesquiterpene emissions from loblolly pine and their potential contribution to biogenic aerosol formation in the Southeastern US.

- Atmos. Environ. 40(22), 4150-4157. Doi: 10.1016/j.atmosenv.2006.02.035
- Hendawy, S.F., A.G. El-Gendy, A.E. El-Gohary, M.S. Hussein, K. Danova, and E.A. Omer. 2015. Evaluation of biomass formation, essential oil yield and composition of four different *Matricaria recutita* L. cultivars grown in Egypt. World J. Pharm. Sci. 3(5), 830-839.
- Homami, S.S., K. Jaimand, M.B. Rezaee, and R. Afzalzadeh. 2016. Comparative studies of different extraction methods of essential oil from *Matricaria recutita* L. Iran. J. Chil. Chem. Soc. 61(2), 2982-2984. Doi: 10.4067/S0717-97072016000200026
- Khourgami, A., G. Sharafi, D. Ahmadiand, and Z. Bitarafan. 2012. Changes of German chamomile essential oil content in response to different plant densities and nitrogen rates. Int. J. Sci. Adv. Technol. 2(4), 19-24.
- Mckay, D.L. and J.B. Blumberg. 2006. A review of the bioactive and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). Phytother. Res. 20, 519-530. Doi: 10.1002/ptr.1900
- Motl, O., M. Felklová, V. Lukes, and M. Jasicová. 1977. GLC analysis and chemical types of chamomile essential oil. Arch. Pharm. 310(3), 210-215. Doi: 10.1002/ardp.19773100306
- Neuhaus-Carlisle, K., W. Vierling, and H. Wagner. 1997. Screening of plant extracts and plant constituents for calcium-channel blocking activity. Phytomedicine 4(1), 67-69. Doi: 10.1016/S0944-7113(97)80030-X
- Nogueira, M.A. and A. Minetto. 2004. Controle de qualidade de chás de camomila (*Matricaria recutita* L.) comercializados na cidade de Cascavel e regiões. Rev. Varia Sci. 4(8), 113-120.
- Palmer-Young, E.C., D. Veit, J. Gershenzon, and M.C. Schuman. 2015. The sesquiterpenes (E)- $\beta$ -farnesene and (E)- $\alpha$ -bergamotene quench ozone but fail to protect the wild tobacco *Nicotiana attenuate* from ozone, UVB, and drought stresses. PLoS ONE 10(6), e0127296. Doi: 10.1371/journal.pone.0127296
- Pavan, M.A., M.F. Bloch, H.C. Zempulski, M. Miyazawa, and D.C. Zoocler. 1992. Manual de análise química do solo e controle de qualidade. Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), Londrina, Brazil.
- Pino, J.A., R. Marbot, J. Agüero, and V. Fuentes. 2000. Essential oil of chamomile *Chamomilla recutita* (L.) Rausch from Cuba. J. Essent. Oil Bear. Pl. 3(1), 1-3. Doi: 10.1080/0972060X.2005.10643411
- Pino, J.A., F. Bayat, R. Marbot, and J. Agüero. 2002. Essential oil of chamomile *Chamomilla recutita* (L.) Rausch from Iran. J. Essent. Oil Res. 14, 407-408. Doi: 10.1080/10412905.2002.9699903
- Salamon, I. 1992. Chamomile: a medicinal plant. The Herb, Spice, and Medicinal Plant Digest 10(1), 1-4.
- Schilcher, H. 1973. Neuere Erkenntnisse bei der Qualitätsbeurteilung von Kamillenblüten bzw. Kamillenöl. Teil 2: Qualitative Beurteilung des Ätherischen Öles in Chamomillae Blüten. Planta Medica 23, 132-144.
- Schmelz, E.A., H.T. Alborn, and J.H. Tumlinson. 2001. The influence of intact-plant and excised-leaf bioassay designs on volicitin and jasmonic acid-induced sesquiterpene volatile release in *Zea mays*. Planta 214(2), 171-179. Doi: 10.1007/s004250100603
- Senkovski, A. and G. Azevedo. 2016. Conheça o Paraná que acalma o Brasil In: <https://www.gazetadopovo.com.br/agronegocio/agricultura/conheca-o-parana-que-acalma-o-brasil-2t22uulbq85g9nfs9zn834c0z>; consulted: November, 2017.
- Silva, F.A.S.E. and C.A.V.A. Azevedo. 2006. A new version of the assistat – statistical assistance software. pp. 393-396. In: World Congress on Computers in Agriculture, Orlando, FL.
- Silva, M.G., S.F. Oliveira, L.J. Quintans-Junior, T.M.L. Oliveira, and M.F.F.M. Diniz. 2005. Investigação do efeito analgésico central e anti-inflamatório de *Conocliniopsis prasiifolia* (DC) R.M. King & H. Robinson em Roedores. Acta Farm. Bonaer. 24(4), 533-537.
- Simepar (Sistema Meteorológico do Paraná). 2015. Estação meteorológica de Pinhais, Boletim. Curitiba, Brazil.
- Singh, O., K. Khanam, N. Misra, and M.K. Srivastava. 2011. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): an overview. Phcog. Rev. 5(9), 82-95. Doi: 10.4103/0973-7847.79103
- Tadrent, W., A. Kabouche, R. Touzani, and Z. Kabouche. 2016. Chemotypes investigation of essential oils of Chamomile herbs: a short review. J. Mater. Environ. Sci. 7(4), 1229-1235.
- Waleczek, K.J., C.H.M. Marques, B. Hempel, and P.C. Schmidt. 2003. Phase solubility studies of pure (2)- $\alpha$ -bisabolol and chamomile essential oil with  $\beta$ -cyclodextrin. Eur. J. Pharm. Biopharm. 55, 247-251. Doi: 10.1016/S0939-6411(02)00166-2

# Propagation of three native Brazilian *Piper* species by cuttings and indole butyric acid

## Propagación de tres especies nativas brasileñas de *Piper* usando estacas y ácido indolbutírico



AUREA PORTES FERRIANI<sup>1</sup>  
CÍCERO DESCHAMPS<sup>1</sup>  
WANDERLEI DO AMARAL<sup>2</sup>  
LUIZ EVERSON DA SILVA<sup>2</sup>

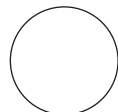
**Propagated Brazilian species of *Piper*.**

Photo: A.P. Ferriani

### ABSTRACT

Native *Piper* species present significant repellent, antimicrobial, insecticidal, anti-tumor and anti-protozoal biological activities. Studies on new species can discover unpublished potentialities and vegetative propagation for the development of cultivation protocols and reduce the natural extraction. The objective of this study was to evaluate the rooting of *P. arboreum*, *P. cernuum* and *P. diospyrifolium* stem cuttings with different treatments containing doses of indole butyric acid (0, 500; 1,000; 1,500; 2,000 and 3,000 mg L<sup>-1</sup>). Branches were collected in the “Bom Jesus Biological Reserve”, Parana state, Brazil. The cuttings, with a length of 12 cm and average diameter of 6 mm, were placed in 53 cm<sup>3</sup> plastic tubes with the commercial substrate Tropstrato HP® and intermittent misting. After 90 days, the survival, mortality, cuttings with new shoots, number and length of the three main roots were evaluated. The percentages of rooting reached an average of 67.5% for *P. arboreum*, 51.6% for *P. cernuum* and 50.4% for *P. diospyrifolium*. A positive effect in the treatments containing the plant regulator was observed for rooting development, percentage of cuttings with shoots and number of roots per propagule, but there were variations in the responses of each species. Leaf retention was an important factor for the adventitious rooting formation in all evaluated species.

**Additional key words:** species domestication, biological activity, essential oil, plant growth regulators, plant propagation.



<sup>1</sup> Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Parana, Curitiba -PR, Brazil. ORCID Ferriani, A.P.: 0000-0002-2896-6427; ORCID Deschamps, C.: 0000-0003-0786-0532

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Territorial Sustentável, Setor Litoral, Universidade Federal do Parana, Matinhos-PR (Brazil). ORCID Amaral, W.d.: 0000-0003-3979-4402; ORCID Silva, L.E.d.: 0000-0002-2332-3553

<sup>3</sup> Corresponding author. aurea.portes@hotmail.com



## RESUMEN

Las especies nativas de *Piper* presentan importantes actividades biológicas repelentes, antimicrobianas, insecticidas, antitumoral y anti-protozoario. Los estudios sobre nuevas especies representan potenciales descubrimientos sin publicar y la propagación vegetativa es necesario para el desarrollo del protocolo de cultivo; además, reduce la extracción natural. El objetivo de esta investigación fue evaluar el enraizamiento de esquejes de *P. arboreum*, *P. cernuum* y *P. diospyrifolium* con diferentes tratamientos que contienen dosis del ácido indolbutírico (0, 500, 1.000, 1.500, 2.000 y 3.000 mg L<sup>-1</sup>). Ramas fueran colectadas en la Reserva Biológica Bom Jesus, estado de Paraná, Brasil. Los cortes con una longitud de 12 cm y el diámetro promedio de 6 mm se instalaron en tubos de plástico de 53 cm<sup>3</sup> usando el sustrato comercial Tropstrato HP® y riego por nebulización intermitente. Después de 90 días se evaluaron las tasas de supervivencia, mortalidad y esquejes con nuevos brotes, número y longitud de las tres raíces principales. Los porcentajes de enraizamiento alcanzaron un promedio de 67,5% para *P. arboreum*, 51,6% para *P. cernuum* y 50,4% para *P. diospyrifolium*. Se encontró respuesta positiva de los tratamientos que contienen el regulador vegetal para las variables de enraizamiento, porcentaje de esquejes con brotes y número de raíces por estaca, pero hubo variaciones en las respuestas de cada especie. La permanencia de hojas fue un factor importante para el proceso de enraizamiento adventicio en las especies evaluadas.

**Palabras clave adicionales:** domesticación de especies, actividad biológica, aceite esencial, reguladores de crecimiento vegetal, propagación de plantas.

Received for publication: 09-10-2017 Accepted for publication: 30-05-2018

## INTRODUCTION

The *Piper* genus has 291 species, of which 184 are endemic to Brazil (Flora do Brasil, 2018). These species have been studied because of the production of essential oil with different biological activities (Pereira *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2012).

*Piper arboreum* Aubl., known as “long pepper”, “rosemary-angola”, “fruit-of-bat”, “jaborandi” and “jaborandi-from-river”, is a perennial shrub with wide distribution, especially in the dense ombrophylous segment of Atlantic Forests (Guimaraes *et al.*, 2006).

Several biological activities in *P. arboreum* result from the essential oil composition, such as a leishmanicidal action attributed to sesquiterpenes (Bernuci *et al.*, 2016). The main constituent, sesquiterpene bicyclogermacrene, was reported in plants from the Federal District area by Potzernheim *et al.* (2006), whereas the oxygenated sesquiterpenes 1-epi-Cubenol, Spathulenol,  $\alpha$ -Cadinol and epi-  $\alpha$ -Muurolol were observed in plants collected from Antonina-PR (Bernuci *et al.*, 2016).

*Piper cernuum* Vell., known as “pariparoba”, is a native non-endemic species found in primary and secondary

forests in Atlantic Tropical Areas (Flora do Brazil, 2018), which has been used in traditional medicine for stomach, liver, kidney and circulatory treatments (Mariot *et al.*, 2007).

The essential oil produced by this species has the monoterpenes  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene and the oxygenated sesquiterpenes spathulenol, epi- $\alpha$ -muurolol,  $\alpha$ -muurolol, caryophyllene oxide and  $\alpha$ -cadinol, which have shown high leishmanicidal activity and moderate anti *M. tuberculosis* activity (Bernuci *et al.*, 2016). The sesquiterpenes dihydro- $\beta$ -agarofuran and 10-epi- $\gamma$ -eudesmol, besides the monoterpenes  $\alpha$ -pinene and camphene, were the main constituents and have shown antibacterial activity (Perigo *et al.*, 2016).

Furthermore, Girola *et al.* (2015) verified induced apoptosis in melanoma cells by a camphene compound isolated from *P. cernuum* essential oil.

*Piper diospyrifolium* Kunth., a semi-heliophilous perennial shrub regionally known as “joao-borandi”, is found in humid areas of dense low montain forests and in lowland forests in Rio de Janeiro, São Paulo and Parana (Brazil) (Guimaraes *et al.*, 2006). The



essential oil composition presented the sesquiterpenes selin-11-en-4- $\alpha$ -ol, germacrene B and  $\alpha$ -selinene, with inhibitory growth potential of *Leishmania* forms (Perigo *et al.*, 2016). Sesquiterpenes were also related to antifungal potential against *Candida* species (Vieira *et al.*, 2011).

These species have a common characteristic, the high environmental regulation of essential oil production (Bergo, 2010; Oliveira *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013; Perigo *et al.*, 2016), which results in differences in yield and composition according to the plant collection location. Even in the same location, high variability can be found in the essential oil production of *Piper* species because of natural propagation through seeds. The development of vegetative protocols could be very useful for these species in order to maintain the essential oil yield and quality of selected plant materials for cultivation.

Some vegetative propagation protocols have been developed for *Piper* using different types of propagules (Cunha *et al.*, 2015; Gomes and Krinski, 2016a), substrates, luminosity and seasonality (Mesquita *et al.*, 2005; Dousseau, 2009; Gomes and Krinski, 2016b; Pacheco *et al.*, 2016; Gasparetto *et al.*, 2017). However, there is a lack of information on propagation for the great majority of species, especially for the three species included in this study.

The objective of this study was to evaluate the root production of *Piper arboreum*, *P. cernuum* and

*P. diospyrifolium* after treatment with indole butyric acid to develop cultivation protocols and reduce extractivism.

## MATERIALS AND METHODS

The botanical specimens used in this study were collected in April, 2016 in the “Biological Reserve Bom Jesus”, Parana state (Brazil), located at 25°29'69.3" S and 49°00'84.4" W, at sea level. Samples of the botanical species were deposited in the herbarium of the “Botanical Museum”, located in the “Botanic Garden of Curitiba” under the numbers MBM 396412 (*Piper arboreum* Aubl.), MBM 396416 (*Piper cernuum* Vell.) and MBM 396413 (*Piper diospyrifolium* Kunth.).

The plant material was collected and moistened in the field until the stem cutting preparation. Cuttings with a length between 10-12 $\pm$ 2 cm and a diameter of 6 $\pm$ 2 mm were prepared maintaining one pair of leaves with half of the leaf area. Before the rooting treatments, the stem cuttings were kept in running water for 5 min.

This experiment was conducted with a completely randomized design for each species, comparing five treatments [immersion in hydro alcoholic solutions containing 0, 500; 1,000; 1,500; 2,000 and 3,000 mg L<sup>-1</sup> of indole butyric acid (IBA) for 10 s], with four replications with 10 cuttings each. After the treatment, the stem cuttings were transferred to polypropylene

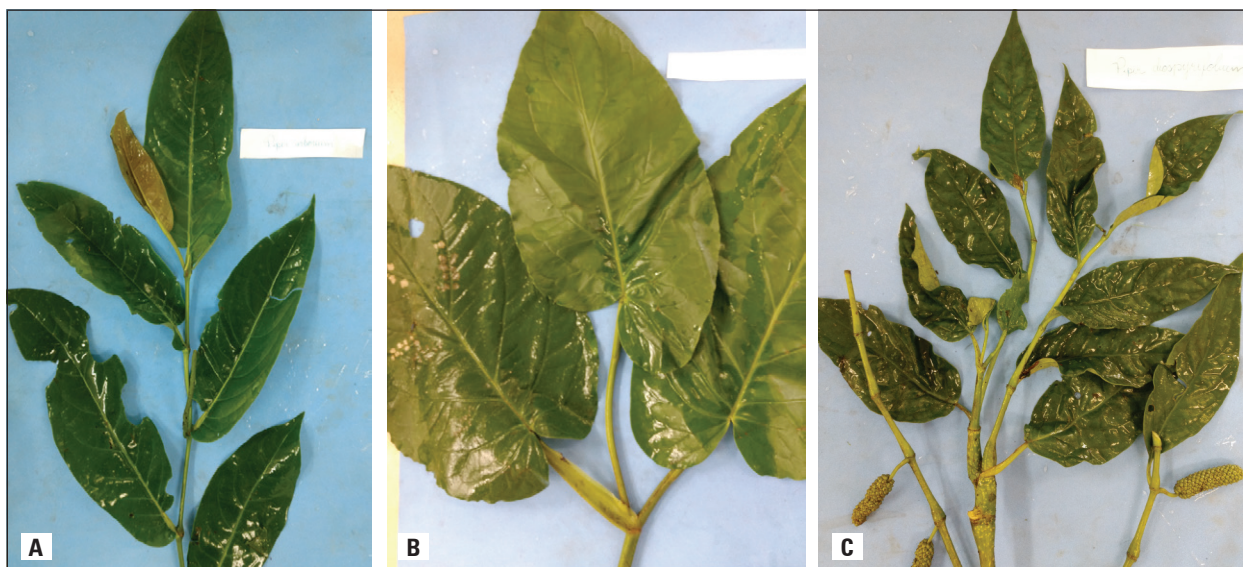


Figure 1. Semihardwood stems from A. *P. arboretum*; B. *P. cernuum*; and C. *P. diospyrifolium* (Ferriani, 2016).

tubes (53 cm<sup>3</sup>) containing the commercial substrate Tropstrato HP® maintained in a greenhouse with intermittent misting, relative humidity around 80% and temperatures ranging for 20-30°C for 90 d.

The rooting percentages, number and average length of the three main roots, foliar retention, sprout and shoot mortality were evaluated. The data was submitted to homogeneity analysis with Bartlett's test and the analysis of variance and regression using the statistical software Assistat (Silva *et al.*, 2016).

## RESULTS AND DISCUSSION

In all analyzed species, the rooting response were positively affected by the plant growth regulator indole butyric acid. *P. arboreum* reached 70% rooting percentage of cuttings when the highest IBA concentration was used (Fig. 2).

Variables related to rooting response, such as leaf retention percentages, number and length of roots were negatively affected by the IBA concentrations over 1,500 mg L<sup>-1</sup>, which may indicate a phytotoxicity effect. These results may be related to the intrinsic capacity of natural vegetative propagation with stolons, as pointed by Souza *et al.* (2009).

In this species, leaf loss at high concentrations of an exogenous regulator affect adventitious rooting because mature leaves act as a source of carbohydrates and cofactors as verified in *P. hispidum*, which presented higher numbers of sprouts and roots in cuttings that maintained a higher number of leaves (Cunha *et al.*, 2015). The rooting of the *P. cernuum* cuttings showed an upward behavior with a maximum of 45% in 3,000 mg L<sup>-1</sup> of IBA, and it was possible to verify that the highest concentrations also promoted the highest percentages of this variable, limited by the plant regulator treatments (Fig. 3).

The percentage of sprout shoots showed a linear increase as a function of the higher IBA concentration. It was not possible to associate the behavior of the leaf retention variable to any treatment whose overall mean was 25.4%. However, for the number and root length variables, it was possible to verify the tendency to increase the values up to the limit of 2,000 mg L<sup>-1</sup>. These results suggest that doses containing higher concentrations may trigger phytotoxic effects, leading to a reduction of the quality of the adventitious root system.

In comparison with other species from the same family, *Piper cernuum* presents a greater leaf area (almost five times greater), which represents higher metabolic intakes and losses. Thus, in this case, the leaf loss was associated with an increase in the percentage of shoots that promoted the translocation of photoassimilates to a critical level, from which there was a reduction in the number and length of the roots.

The *P. diospyrifolium* cuttings reached a percentage of rooting of 70%, being influenced by the application of IBA treatments up to the concentration of 1,500 mg L<sup>-1</sup>, since there was a reduction in the means of this variable with the higher IBA concentrations (Fig. 4).

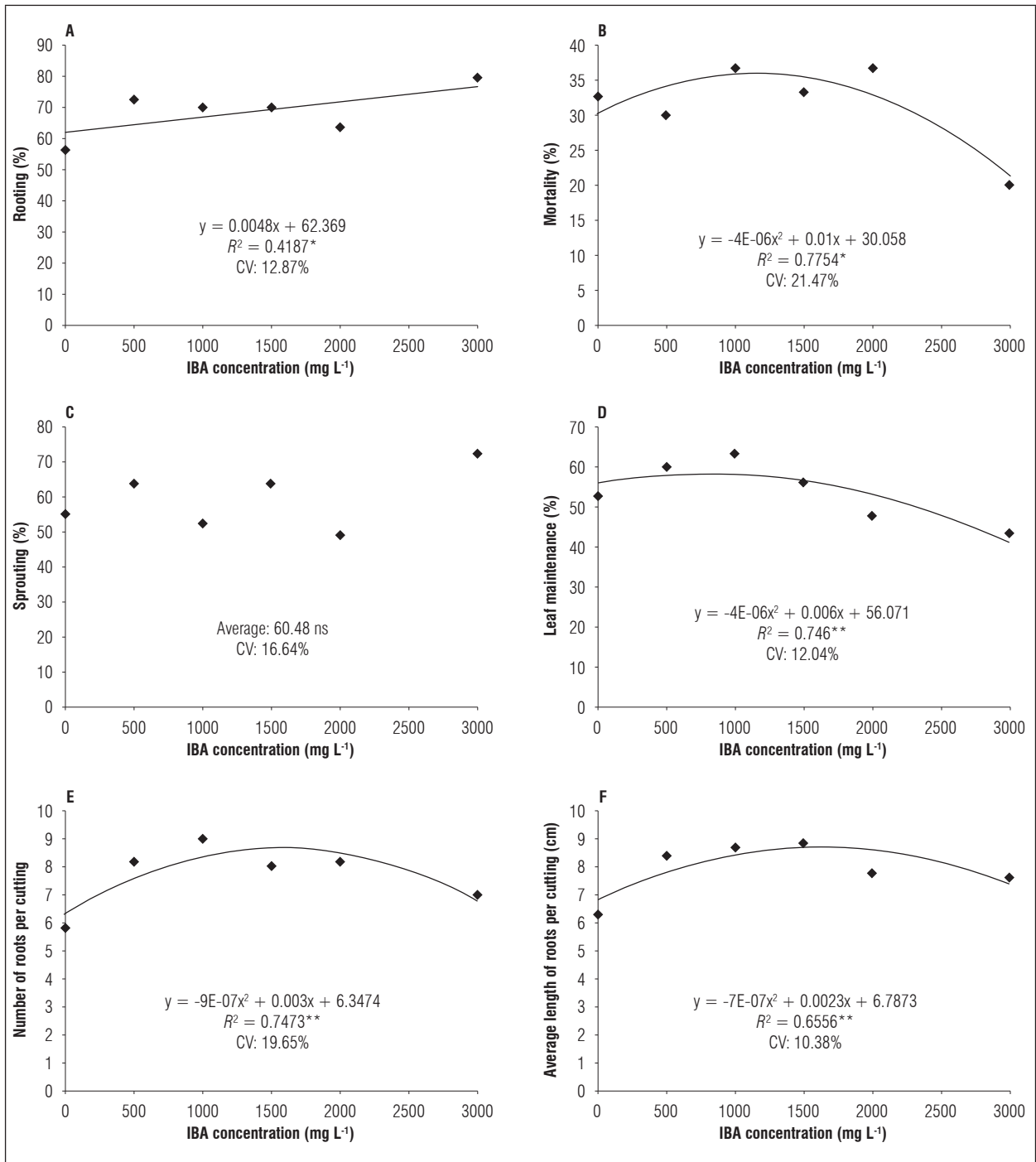
The percentages of sprouts and leaf retention indicate that high doses of the plant regulator may have caused foliar abscission, interfering in propagule sprouting and, consequently, in root induction and the root length variable. Vignolo *et al.* (2014) verified a similar behavior for the cuttings of three blackberry (*Rubus spp.*) cultivars, where the presence of leaves positively affected the sprouting and rooting in all of the evaluated cultivars.

The number of roots varied linearly as a function of the plant regulator treatments. In *Piper mikanianum*, Pescador *et al.* (2007) related an increase in the rooting rate with the foliar maintenance and sprout formation in the cuttings. According to Hartmann *et al.* (2002), mature leaves and sprouting development increase the synthesis of cofactors related to the rooting process.

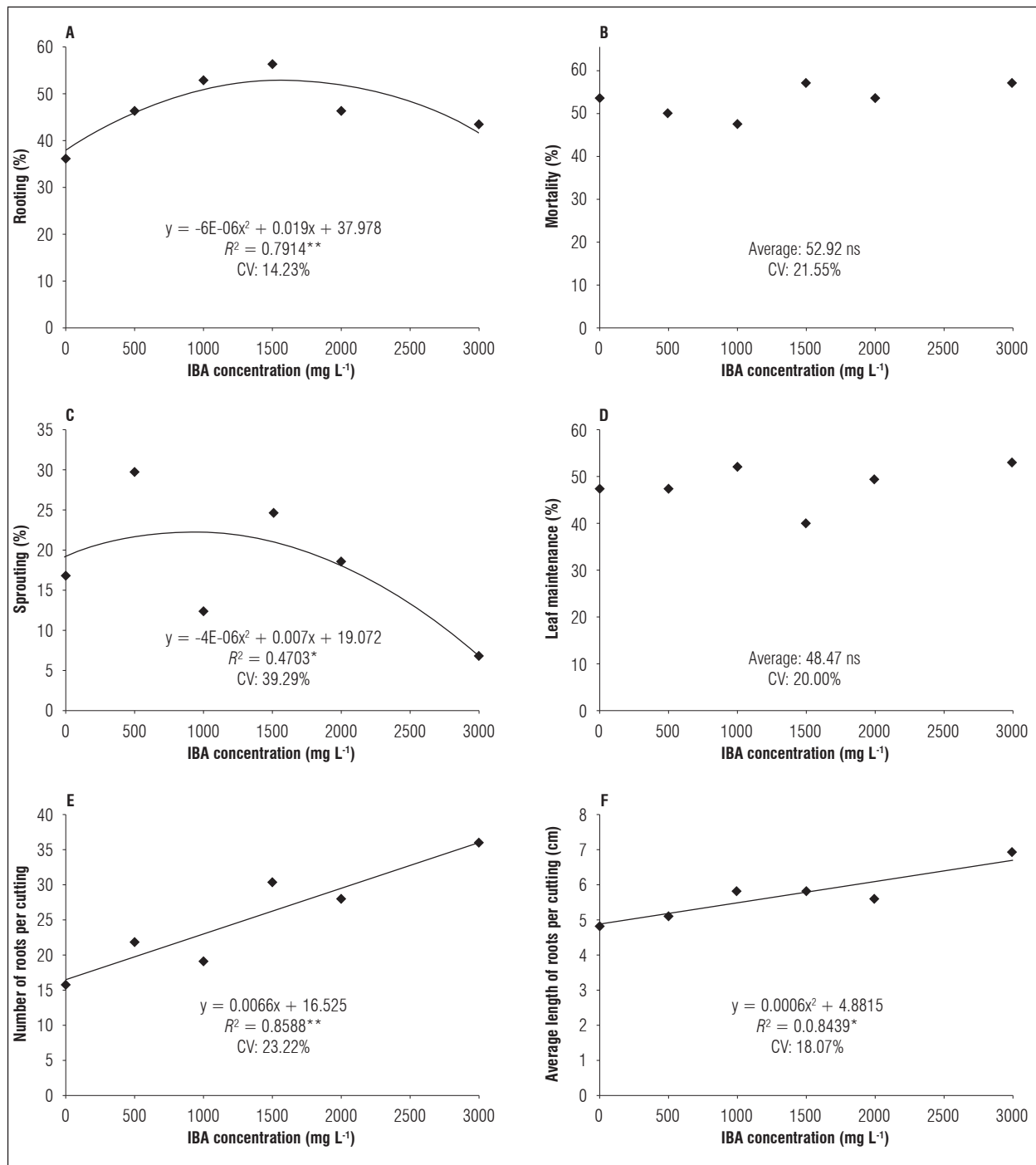
These results show the importance of the specific evaluation of rooting production for each *Piper* species since they present different responses in root induction and development.

The formation of an adventitious rooting system is dependent on the endogenous level of hormones and other rooting promoters (Hartmann *et al.*, 2002). In *P. hispidum* for example, the rooting of stem cuttings reached percentages greater than 80% without the application of exogenous auxins (Cunha *et al.*, 2015), and stem cuttings from *P. amalago* reached only 22% under the same auxin concentration (Gomes and Krinski, 2016a).

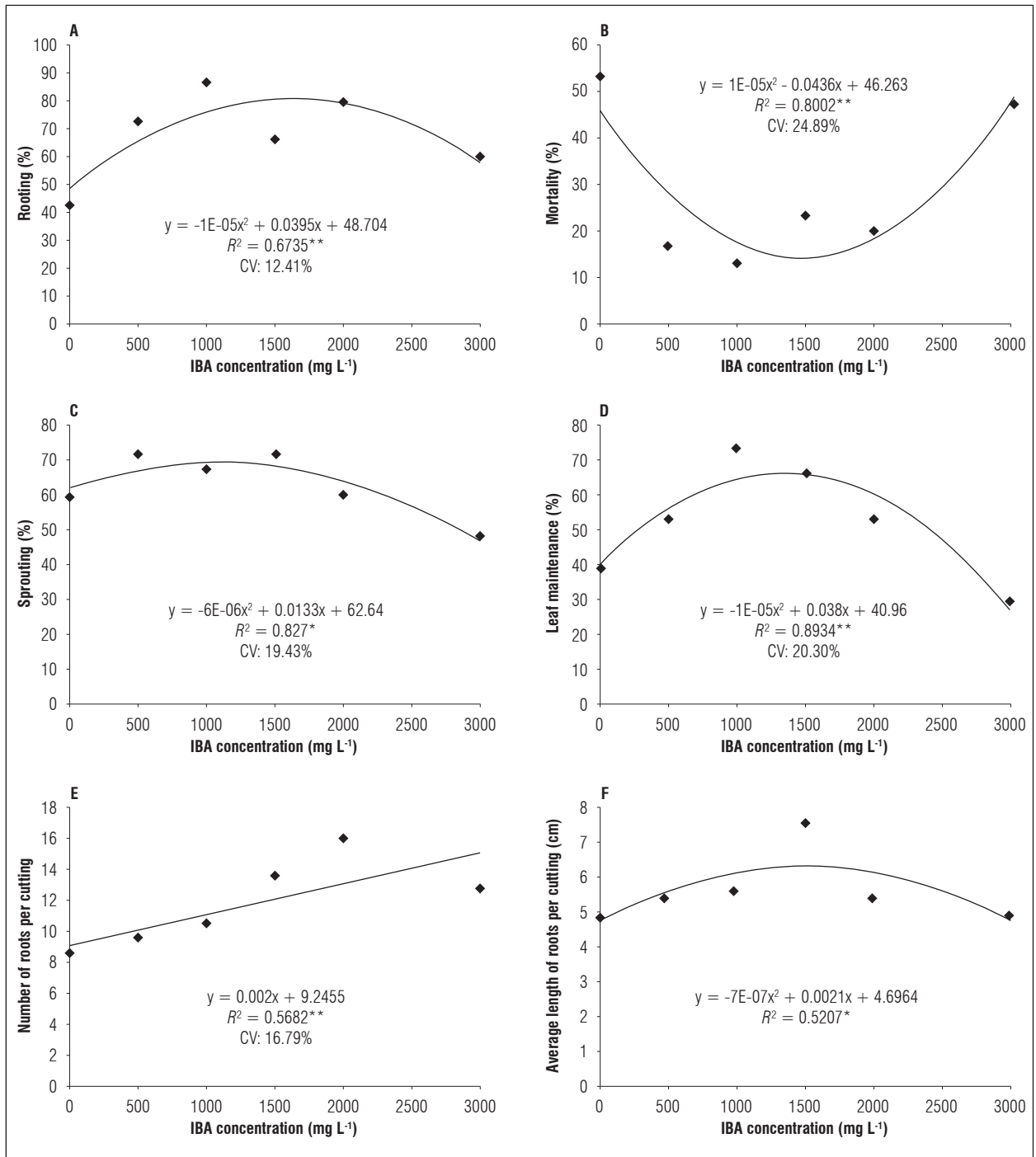
Other studies that consider the seasons for plant collection are recommended for the root production of these species.



**Figure 2.** Rooting percentage, mortality, sprouting, leaf retention, number and average length of roots in the *P. arboreum* cuttings. **\*\*Significant at 1% probability according to polynomial regression analysis; \*significant at 5% probability according to polynomial regression analysis. ns: not significant. CV: coefficient of variation.**



**Figure 3.** Rooting percentage, mortality, sprouting, leaf retention, number and average length of roots in the *P. cernuum* cuttings. \*\*Significant at 1% probability according to polynomial regression analysis; \*Significant at 5% probability according to polynomial regression analysis. ns: not significant. CV: coefficient of variation.



**Figure 4.** Rooting percentage, mortality, sprouting, leaf retention, number and average length of roots in the *P. diospyrifolium* cuttings. \*\*Significant at 1% probability according to polynomial regression analysis; \*Significant at 5% probability according to polynomial regression analysis. ns: not significant. CV: coefficient of variation.



The present study provides unprecedented information on the propagation of these *Piper* species, which will help establish protocols that guarantee sustainable cultivation practices since the current use of raw material is exclusively obtained with extractivism.

## CONCLUSIONS

All of the evaluated species presented an increase in root production after treatment with indole butyric acid. The rooting percentages reached averages of 67.5% for *P. arboreum*, 51.6% for *P. cernuum* and 50.4% for *P. diospyrifolium*.

These positive results show the importance of specific studies on the domestication of *Piper* native species for crops development.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by funding from the Agronomy Graduate Program of University of Parana. The authors are grateful for the funding provided by CAPES (Brazilian Agency Foundation for Research), which sponsored the second author's graduate studies. We also gratefully acknowledge the "Environment Institute of Parana State" for providing the license to collect and transport the plant material and "The Botanic Garden of Curitiba", Parana State, for species identification.

**Conflict of interests:** the manuscript was prepared and reviewed with the participation of the authors, who declare that there exists no conflict of interest that puts the validity of the presented results at risk.

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Bergo, C.L. 2010. Estudos agronômicos e fitoquímicos de *Piper hispidinervum* C.DC. e *Piper aduncum* L. para produção de safrol e dilapiol. Ph.D. thesis. Universidade Federal do Parana, Curitiba-PR, Brazil.
- Bernuci, K.Z., C.C. Iwanaga, C.M.M. Fernandez-Andrade, F.B. Lorenzetti, E.C. Torres-Santos, V.S. Faiões, J.E. Gonçalves, W. Amaral, C. Deschamps, R.B.L. Scodro, R.F. Cardoso, V.P. Baldin, and D.A.G. Cortez. 2016. Evaluation of chemical composition and antileishmanial and antituberculosis activities of essential oils of piper species. *Molecules* 21(1698), 3-12.
- Cunha, A.L.B., F.C.M. Chaves, A.C. Batista, and A.F. Hidalgo. 2015. Propagação vegetativa de estacas de *Piper hispidum* Sw. em diferentes substratos. *Rev. Bras. Plantas Med.* 17(4), 685-692. 10.1590/1983-084X/14\_113
- Dousseau, S. 2009. Propagação, características fotossintéticas, estruturais, fitoquímicas e crescimento inicial de *Piper aduncum* L. (Piperaceae). Tesis. Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Brazil.
- Flora do Brasil. 2018. Piperaceae. In: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12735>; consulted: March, 2018.
- Gasparetto, A., A.B. Cruz, T.M. Wagner, T.J. Bonomini, R. Correa, and A. Malheiros. 2017. Seasonal variation in the chemical composition, antimicrobial and mutagenic potential of essential oils from *Piper cernuum*. *Ind. Crops Prod.* 95, 256-263. Doi: 10.1016/j.indcrop.2016.10.030
- Girola, N., C.R. Figueiredo, C.F. Farias, R.A. Azevedo, A.K. Ferreira, S.F. Teixeira, T.M. Capello, E.G.A. Martins, A.L. Matsuo, L. Travassos, and J.H.G. Lago. 2015. Camphene isolated from essential oil of *Piper cernuum* (Piperaceae) induces intrinsic apoptosis in melanoma cells and displays antitumor activity in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 467(4), 928-934. Doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.041
- Gomes, E.N. and D. Krinski. 2016a. Propagação vegetativa de *Piper amalago* L. (Piperaceae) em função de tipos de estaca e substratos. *Cult. Agron.* 25(2), 199-210.
- Gomes, E.N. and D. Krinski. 2016b. Propagação vegetativa de *Piper umbellatum* L. (Piperaceae) em função de substratos e comprimentos de estacas. *Sci. Agrar.* 17(3), 31-37.
- Guimaraes, E.F. and D. Monteiro. 2006. Piperaceae na reserva biológica de Poço das antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguésia* 57(3), 567-587. Doi: 10.1590/2175-7860200657312
- Hartmann, H.T., D.E. Kester, F.T. Davies Junior, and R.L. Geneve. 2002. Principles of propagation by cuttings. pp. 280-343. En: Hartmann, H.T., F.T. Davies, and D.E. Kester (eds.). *Plant propagation: principles and practices*. 7<sup>th</sup> ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA.
- Lopes, J.J., C. Marx, R. Ingrassia, J.N. Picada, P. Pereira, and A.B.F. Ferraz. 2012. Neurobehavioral and toxicological activities of two potentially CNS-acting medicinal plants of *Piper* genus. *Exp. Toxicol. Pathol.* 64, 9-14. Doi: 10.1016/j.etp.2010.05.012
- Mariot, A., J.V. Odorizzi, J. Nascimento, and M.S. Reis. 2007. Uso e conservação de *Piper cernuum* Vell. (Piperaceae) na Mata Atlântica: II. Estrutura demográfica e potencial de manejo em floresta primária e secundária. *Rev. Bras. Plantas Med.* 9(1), 13-20.
- Mesquita, J.M.O., C. Cavaleiro, A.P. Cunha, J.A. Lombardi, and A.B. Oliveira. 2005. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de

- Piperaceae. Rev. Bras. Farmacogn. 15, 6-12. Doi: 10.1590/S0102-695X2005000100003
- Oliveira, G.B., D.L. Moreira, A.D.R. Mendes., E.F. Guimarães, L.S. Figueiredo, M.A.C. Kaplan, and E.R. Martins. 2013. Growth study and essential oil analysis of *Piper aduncum* from two sites of Cerrado biome of Minas Gerais State, Brazil. Rev. Bras. Farmacogn. 23(5), 743-753. Doi: 10.1590/S0102-695X2013000500005
- Pacheco, F.V., R.P. Avelar, I.C.A. Alvarenga, S.K.V. Bertolucci, A.A. Alvarenga, and J.E.B.P. Pinto. 2016. Essential oil of monkey-pepper (*Piper aduncum* L.) cultivated under different light environments. Ind. Crops Prod. 85, 251-257. 10.1016/j.indcrop.2016.03.016
- Pereira, A.C.R.L., J.V. Oliveira, M.G.C. Gondim-Junior, and C.A.G. Câmara. 2008. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. Ciênc. Agrotec. 32(3), 717-724. Doi: 10.1590/S1413-70542008000300003
- Perigo, C.V., R.B. Bernacci, E.F. Guimaraes, L.L. Haber, R. Facanali, M.A.R. Vieira, V. Quecini, and M.O.M. Marques. 2016. The chemical composition and antibacterial activity of eleven *Piper* species from distinct rainforest areas in Southeastern Brazil. Crops Natural Prod. 94, 528-539. Doi: 10.1016/j.indcrop.2016.09.028
- Pescador, R., A.C. Voltoni, C.G. Rolaardi, and F.A. Rosa. 2007. Estaquia de pariparoba-do-Rio Grande do Sul sob efeito do ácido indol-butírico em dois substratos. Sci. Agric. 8(4), 391-398. Doi: 10.5380/rsa.v8i4.9886
- Potzernheim, M., H.R. Bizzo, T.S. Agostini-Costa, R.F. Vieira, M. Carvalho-Cilva, and L.A.M.B. Gracindo 2006. Chemical characterization of seven *Piper* species (Piperaceae) from Federal District, Brazil, based on volatile oil constituents. Rev. Bras. Plantas Med. 8, 10-12.
- Silva, R.J.F., A.C.A. Aguiar-Dias, K.C.F. Faial, and M.S. Mendonça. 2016. Caracterização farmacognóstica de *Piper arboreum* e *P. tuberculatum* (Piperaceae). Acta Amaz. 46(2), 195-208. Doi: 10.1590/S0044-59672007000200004
- Silva, F.A.S. and C.A.V. Azevedo. 2016. Comparison of means of agricultural experimentation data through different tests using the software assistat. Afr. J. Agric. Res. 37(11), 3527-3531.
- Silva, A.L.L., F.C.M. Chaves, R.C. Lameira, and R.C. Bizzo. 2013. Rendimento e composição do óleo essencial de *P. aduncum* L. cultivado em Manaus, AM, em função da densidade de plantas e épocas de corte. Rev. Bras. Plantas Med. 15(4), 670-674. Doi: 10.1590/S1516-05722013000500007
- Souza, L.A.d., I.S. Moscheta, K.S.M. Mourão, A.L.M. Albiero, M.d.C. Iwazaki, J.H.G.d. Oliveira, and S.M.d. Rosa. 2009. Vegetative propagation in Piperaceae species. Braz. Arch. Biol. Biotechnol. 52(6), 1357-1361. Doi: 10.1590/S1516-89132009000600006
- Vieira, S.C.H., L.F. Paulo, T.I.E. Svidzinski, B.P. Dias Filho, C.V. Nakamura, A. Souza, M.C.M. Young, and D.A.G. Cortez. 2011. Antifungal activity of *P. diospyrifolium* Kunth, (Piperaceae) essential oil. Braz. J. Microbiol. 42, 1001-1006. Doi: 10.1590/S1517-83822011000300020
- Vignolo, G.K., L. Picolotto, M.A. Goncalves, I.S. Pereira, and L.E.C. Antunes. 2014. Presença de folhas no enraizamento de estacas de amoreira-preta. Cienc. Rural 44(3), 467-472. Doi: 10.1590/S0103-84782014000300013

# Efecto de cuatro inhibidores de etileno en la maduración del fruto de café (*Coffea arabica* L.) durante precosecha

## Effects of four ethylene inhibitors on the ripening of coffee (*Coffea arabica* L.) fruits during the pre-harvest period

CARLOS ANDRÉS UNIGARRO<sup>1, 5</sup>  
CLAUDIA PATRICIA FLÓREZ<sup>2</sup>  
CARLOS EUGENIO OLIVEROS<sup>3</sup>  
MYRIAM CAÑÓN<sup>4</sup>



Cafeto en producción.

Foto: C.P. Flórez

### RESUMEN

En el proceso natural de maduración de los frutos climatéricos, se puede modificar e intervenir los mecanismos de acción del etileno durante precosecha y poscosecha. En algunos frutos los inhibidores del etileno han permitido retardar su desarrollo. En esta investigación se evaluó el efecto de cuatro inhibidores de etileno en el desarrollo de frutos de café durante precosecha. En la Estación Experimental Paraguaicito de Cenicafe (04°23' N y 75°44' W, Quindío, Colombia) en un cultivo de café variedad Castillo® Paraguaicito, se instalaron bajo un diseño de bloques completos al azar 13 tratamientos correspondientes a cuatro inhibidores de etileno que fueron acetato de potasio (0,5; 1,0 y 2,0% P/V), ácido aminoocxiacético (1, 5 y 10 mg L<sup>-1</sup>), ácido salicílico (1, 5 y 10 mM) y aminoetoxi-vinil-glicina (25, 50 y 100 µg L<sup>-1</sup>) en tres diferentes dosis, además de un testigo absoluto. Los inhibidores se aplicaron 1 semana antes del pico de cosecha y 4 semanas después. Se evaluaron las variables producción de café cereza, peso de un fruto, frutos caídos y el porcentaje de frutos inmaduros, pintones, maduros y sobremaduros. Esto se realizó en la cosecha principal de 2016 y la cosecha secundaria de 2017. En la cosecha principal, los tratamientos aminoetoxi-vinil-glicina (100 µg L<sup>-1</sup>) y ácido salicílico (1 mM) retardaron el proceso de maduración al reducir entre 16,0 y 16,6% el porcentaje de frutos sobremaduros y aumentar entre 12,8 y 14,3% el porcentaje de frutos maduros, respecto al testigo absoluto. En la cosecha secundaria, los tratamientos y el testigo no difirieron significativamente en ninguna de las variables evaluadas.

**Palabras clave adicionales:** desarrollo del fruto, retardante, ácido salicílico, aminoetoxi-vinil-glicina.

<sup>1</sup> Disciplina de Fisiología Vegetal, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Manizales (Colombia). ORCID Unigarro, C.A.: 0000-0002-7344-3211

<sup>2</sup> Disciplina de Mejoramiento Genético, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Manizales (Colombia). ORCID Flórez, C.P.: 0000-0003-2859-3496

<sup>3</sup> Disciplina de Poscosecha, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Manizales (Colombia). ORCID Oliveros, C.E.: 0000-0002-6432-2557

<sup>4</sup> Estación Experimental Paraguaicito, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Manizales (Colombia). ORCID Cañón, M.: 0000-0001-7584-0790

<sup>5</sup> Autor para correspondencia. andresunigarro@gmail.com

## ABSTRACT

The natural ripening process in climacteric fruits can be modified by intervening in the mechanisms of ethylene action, either pre-harvest or post-harvest. In some fruits, ethylene inhibitors retard development. In this research, the effect of four ethylene inhibitors on the development of coffee fruits during the pre-harvest period was evaluated. At the Paraguaicito Experiment Station of Cenicafé (04°23' N and 75°44' W, Quindío, Colombia) with a coffee crop of the Castillo® Paraguaicito variety, 12 treatments were carried out with four ethylene inhibitors [potassium acetate (0.5, 1.0 and 2.0% P/V), aminooxyacetic acid (1, 5 and 10 mg L<sup>-1</sup>), salicylic acid (1, 5 and 10 mM) and aminoethoxy-vinyl-glycine (25, 50 y 100 µg L<sup>-1</sup>)] at three different doses, in addition to an absolute control, using a randomized complete block design. The inhibitors were applied 1 week before the harvest peak, and, 4 weeks later, the variables cherry coffee production, fruit weight, dropped fruits and percentages of immature, early ripe, ripe, and overmature fruits were evaluated. This was done in the main harvest of 2016 and the secondary harvest of 2017. In the main harvest, the treatments aminoethoxy-vinyl-glycine (100 µg L<sup>-1</sup>) and salicylic acid (1 mM) delayed the ripening process by reducing the percentage of overmature fruits by between 16.0 and 16.6% and by increasing the percentage of ripe fruits by between 12.8 and 14.3%, with respect to the absolute control. In the secondary harvest, the treatments and the control did not differ significantly in any of the evaluated variables.

**Additional key words:** fruit development, retardant, acid salicylic, aminoethoxy-vinyl-glycine.

Fecha de recepción: 23-01-2018 Aprobado para publicación: 30-05-2018

## INTRODUCCIÓN

Dentro del género *Coffea* compuesto por más de 124 especies (Davis *et al.*, 2011), solo *Coffea arabica* L. y *C. canephora* Pierre ex Froehner son relevantes para los países exportadores de café, con el 63 y 37% de la producción mundial, respectivamente (ICO, 2017). El beneficio económico del café también depende de la calidad de la bebida, la cual está influenciada entre otros factores, por el estado de maduración del fruto al momento de la cosecha (Pereira *et al.*, 2005; Da-Matta *et al.*, 2007). La calidad de la bebida se afecta con sabores y aromas desperfectos (sucio, fermento, *stinker*, tierra y sabores desagradables), cuando un 2,5% o más de la masa total cosechada corresponde a frutos inmaduros (Puerta, 2000; Pezzopane *et al.*, 2012), mientras que los frutos secos producen una tasa "dura" o imbebible (Puerta, 2000). Marín *et al.* (2003) encontraron que las tazas preparadas con café de los estados pintón, maduro y sobremaduro dieron buena calidad. En la zona cafetera de Colombia, la desigual maduración de los frutos es el resultado de la asincronía floral causada por la distribución de la precipitación a lo largo del año (Camayo *et al.*, 2003); este hecho propicia cosechas escalonadas con varias recolecciones selectivas del fruto maduro (Upegui y Valencia, 1972).

En la maduración del fruto ocurren una serie de cambios bioquímicos, fisiológicos y estructurales, que hacen del fruto atractivo al consumidor (Lelièvre *et al.*, 1997). La escala fenológica BBCH para café indica que un fruto está funcionalmente maduro (semilla) cuando alcanza el 90% de su tamaño final y presenta un color verde pálido (estado BBCH-79), aunque en términos organolépticos, la madurez de cosecha solo se alcanza cuando el exocarpo se torna de un color rojo o amarillo según la variedad (estado BBCH-88) (Arcila *et al.*, 2002). En términos fisiológicos los frutos se clasifican en dos grandes grupos, dependiendo de la presencia (climatéricos) o ausencia (no climatéricos) de un pico en la respiración asociado con un incremento en la síntesis del etileno al inicio de la maduración (Lelièvre *et al.*, 1997). Miembros de la misma especie o cercanamente relacionados pueden incluir variedades climatéricas y no climatéricas (Giovannoni, 2004).

El proceso de maduración de los frutos de café, sugiere un comportamiento climatérico, dada la regulación de los genes de la biosíntesis del etileno en la maduración de los frutos (Pereira *et al.*, 2005), el incremento en la respiración asociado a la elevada producción de etileno (Ságio *et al.*, 2013) y a la sincronización de la

maduración en respuesta a aplicaciones exógenas de Ethrel (Winston *et al.*, 1992). El etileno es una poderosa hormona vegetal efectiva a concentraciones desde una parte por millón (ppm,  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) hasta una parte por billón (ppb,  $\text{nL L}^{-1}$ ) (Saltveit, 1999) que además de participar en la maduración y senescencia de los frutos, regula los procesos de germinación en semillas, desarrollo de pelos radicales, nodulación en raíces, iniciación floral, la senescencia foliar y floral (Abeles *et al.*, 1992; Guo y Ecker, 2004; Kesari *et al.*, 2007).

La maduración de los frutos climatéricos puede regularse durante precosecha o poscosecha, interviniendo los mecanismos de acción del etileno con promotores o inhibidores químicos (Burns, 2008; Balaguera *et al.*, 2014). Promotores químicos como el "Ethephon" o "Ethrel" (ácido 2-cloroetilfosfónico), se usan para acelerar y uniformizar la maduración en muchos cultivos incluyendo algodón, café, caña de azúcar, manzanas y tomates (Winston *et al.*, 1992). En Colombia, la madurez organoléptica del fruto de café cereza se anticipó en cuatro semanas con el uso de "Ethrel", pero la acidez y el cuerpo de la bebida se afectó negativamente (Arcila, 1975).

Los inhibidores químicos del etileno actúan retardando el avance natural de la maduración en frutos, hortalizas y flores (Arora *et al.*, 2008; Balaguera *et al.*, 2014). Estos funcionan inhibiendo la biosíntesis del etileno [aminoetoxi-vinil-glicina (AVG), ácido aminooxiacético (AOA)], inhibiendo la señalización del etileno [1-metilciclopropeno (1-MCP), 2,5-norbornadieno (NBD), tiosulfato de plata (STS)] (Serek *et al.*, 2006) y/o ambas formas, como es el caso del ácido salicílico (Srivastava y Dwivedi, 2000). Otros funcionan oxidando el etileno (remoción química), siendo el permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ) el producto más importante (Wills y Warton, 2004). El uso de la combinación entre ácido acético e hidróxido de potasio en su formulación comercial Mathury® disminuyó la caída de frutos en la cosecha mecanizada de café variedad Catuaí Vermelho IAC 15 (Dias *et al.*, 2014). Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de cuatro inhibidores de etileno en el desarrollo de frutos de café en precosecha.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Estación Experimental Paraguaicito de Cenicafe ubicada en Buena Vista, Quindío, Colombia ( $04^{\circ}23' \text{ N}$  y  $75^{\circ}44' \text{ W}$ , a 1.203 msnm), en plantas de café con 38 meses de edad de la variedad

Castillo® Paraguaicito (*C. arabica* L.) establecidas a una densidad de 7.143 plantas/ha (1,0 m entre plantas  $\times$  1,4 m entre surcos) en septiembre del 2014. Las pruebas en campo se realizaron en la cosecha principal del 2016 (3 octubre a 4 noviembre) y la cosecha secundaria del 2017 (17 abril a 19 mayo).

Antes de cada cosecha, se instalaron 12 tratamientos correspondientes a cuatro inhibidores de etileno (acetato de potasio – "PA", ácido aminooxiacético – "AOA", ácido salicílico – "AS" y aminoetoxi-vinil-glicina – "AVG") químicamente puros en tres diferentes dosis (Tab. 1), además de un testigo absoluto (sin aplicación alguna de productos o de agua), bajo un diseño de bloques completos al azar (DBCA) con 12 bloques. La parcela experimental se conformó por 20 árboles, de los cuales los seis centrales constituían la parcela efectiva. Los tratamientos se aplicaron sobre los frutos una semana antes del pico de cosecha (estimado mediante los registros de floración), apuntando la boquilla de la bomba manual operada a 2 bares desde la parte ventral de la rama hacia los frutos, a una distancia de 5 cm. El coadyuvante agrícola Silwet® L-77 AG (Adama Agricultural Solutions, Raleigh, NC, USA) se utilizó como adherente con los inhibidores a una dosis de  $0,5 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}$ . Entre 150 y 250 mL de la solución fueron aplicados sobre cada planta. Luego de realizada la aplicación, se removió todo el material vegetal (arvenses, ramas, hojas y frutos caídos) presente en el suelo de las parcelas efectivas.

**Tabla 1. Aplicación de inhibidores de etileno en café variedad Castillo®.**

Ingrediente activo	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3
Aminoetoxi-vinil-glicina (AVG) ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	25	50	100
Ácido salicílico (AS) (mM)	1	5	10
Acetato de potasio (PA) (% P/V)	0,5	1,0	2,0
Ácido aminooxiacético (AOA) ( $\text{mg L}^{-1}$ )	1	5	10

Los atributos de producción y desarrollo se evaluaron 4 semanas después de implementados los tratamientos. De acuerdo con Marín *et al.* (2003), la transición por los estados de maduración de pintón (210 días después de floración: ddf), maduro (217 ddf) y sobremaduro (224 ddf) toma en promedio 7 d, con base en ello y asumiendo que en pico de cosecha se recolectan frutos principalmente maduros, el experimento llevado a cabo, extendió la permanencia de los frutos maduros en los cafetos por 3 semanas, tiempo suficiente para exceder el estado sobremaduro.



La producción de café cereza (g) se recolectó manualmente de las seis plantas que conforman la parcela efectiva. De igual forma los frutos caídos. El peso de un fruto (g) se calculó con base en el promedio de 100 frutos maduros de café cereza por parcela. El porcentaje de frutos inmaduros (estado BBCH 81), pintones (estado BBCH 85), maduros (estado BBCH 88) y sobremaduros (estado BBCH 89) se obtuvo de clasificar visualmente la coloración de los frutos según la descripción fenológica de la escala BBCH (Arcila *et al.*, 2002), en una muestra de 1 kg, la cual fue retirada de la producción por parcela después de su cosecha.

El análisis estadístico de las variables producción de café cereza, peso de un fruto y frutos caídos fue realizado usando el procedimiento PROC GLM del Software SAS v. 9.4 (SAS Institute, 2012). En el caso de las variables porcentaje de frutos inmaduros, pintones, maduros y sobremaduros se usó el procedimiento PROC GLIMMIX del software SAS (SAS Institute, 2012), considerando la distribución Beta [0,1], según las consideraciones de Stroup (2015) para los DBCA. La prueba de Dunnett al nivel de significancia del 5% se realizó para determinar la diferencia de medias entre el testigo absoluto y cada uno de los tratamientos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la cosecha principal (Tab. 2), el análisis de varianza no encontró diferencias significativas en las variables producción de café cereza, frutos caídos y porcentaje de frutos inmaduros. El porcentaje de frutos maduros y sobremaduros en los tratamientos AVG ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y AS (1 mM) fue significativamente diferente al valor del testigo absoluto (Tab. 2). Estos tratamientos lograron retardar el proceso natural de maduración con relación al testigo absoluto, al reducir entre 16,0 y 16,6% el porcentaje de frutos sobremaduros e incrementar entre 12,8 y 14,3% el porcentaje de frutos maduros. El efecto se vio reflejado en la coloración del fruto mas no en el pedúnculo, puesto que la caída de frutos no fue afectada bajo los criterios en los que se evaluó esta característica. En el caso de las variables peso de fruto y porcentaje de frutos pintones, aunque presentaron diferencias significativas en el análisis de varianza, éstas no se reflejaron al comparar los tratamientos respecto al testigo (Tab. 2).

Aunque existe poca información sobre la acumulación del AS durante el desarrollo de los frutos y su rol en maduración (Davies y Böttcher, 2014), reportes en banano (Srivastava y Dwivedi, 2000), fresa (Karlidag

*et al.*, 2009), peral (Leslie y Romani, 1988), uva (Kraeva *et al.*, 1998) y tomate (Wang *et al.*, 2011), sugieren un papel antagonista en la síntesis del etileno, tanto en frutos climatéricos como no climatéricos. La concentración efectiva de AS en el presente estudio concuerda con las reportadas por Berlanga-Reyes *et al.* (2011) ( $0,01$  y  $1,0 \mu\text{M}$  de AS) en precosecha para retardar la concentración interna de etileno y el cambio de color de la epidermis en manzana 'Golden Delicious'. Champa *et al.* (2015) lograron extender la vida poscosecha de uva cv. Flame Seedless (fruto no climatérico) en 15 d, al realizar aspersiones precosecha de AS a una concentración de 1,5 mM.

El AVG es un inhibidor natural de la biosíntesis del etileno (Abeles *et al.*, 1992), usado para retardar los procesos de maduración y disminuir la caída de frutos (Greene, 2005). Yildiz *et al.* (2012) observaron que al aumentar las concentraciones de AVG (de  $150$  a  $600 \text{ mg L}^{-1}$ ) incrementaron los valores relativos de frutos maduros con respecto al control en manzana 'Red Chief'. Una respuesta muy similar se encontró en el actual trabajo, puesto que la mejor respuesta se presentó con la dosis más alta probada, la cual mostró una reducción del desarrollo natural apreciable desde la coloración. Dal Cin *et al.* (2008) retardaron el cambio en color de los frutos de manzana con AVG, lo cual, desacelero significativamente la madurez. Aunque es conocido que con el aumento de las concentraciones de AVG la caída de frutos en precosecha se reduce de forma lineal (Greene, 2005), esto no ocurrió bajo las condiciones experimentales evaluadas.

En la cosecha secundaria (Tab. 3), los tratamientos y el testigo no difirieron significativamente en ninguna de las variables evaluadas. En este periodo el desarrollo de los frutos fue mayor, evidencia de ello son los promedios generales, los cuales fueron mayores en relación a los de la cosecha principal para las variables porcentaje de frutos sobremaduros y frutos caídos (Tab. 2 y 3). La distribución y cantidad de lluvia, posiblemente afectaron la madurez de los frutos al estimular el desarrollo más allá del efecto provisto por los inhibidores o al facilitar el lavado de los tratamientos aplicados. La precipitación diaria acumulada durante los primeros 16 d de la cosecha secundaria (106 mm) fue el doble de la registrada para la cosecha principal (49 mm) en el mismo lapso de tiempo, de igual modo, la precipitación total acumulada en la segunda cosecha superó a la alcanzada en la principal (364 y 287 mm, respectivamente) (Fig. 1). La temperatura media general en ambas cosechas fue de  $21,7 \text{ }^\circ\text{C}$ , motivo por

el cual no pudo ser un factor diferencial para el desarrollo del fruto (Fig. 1).

Aunque en la presente investigación el inhibidor acetato de potasio no incrementó el porcentaje de frutos

maduros de café como lo reporta Silva *et al.* (2013), si se observó al igual que en su investigación, que la producción de café cereza dependió más de la época de cosecha (producción de la cosecha principal vs. secundaria) que a la variación entre los tratamientos y

**Tabla 2. Efecto de la aplicación de cuatro inhibidores de etileno en café variedad Castillo® 4 semanas después de comenzar la recolección, en Buena Vista (Colombia) durante una cosecha principal (octubre a noviembre del 2016).**

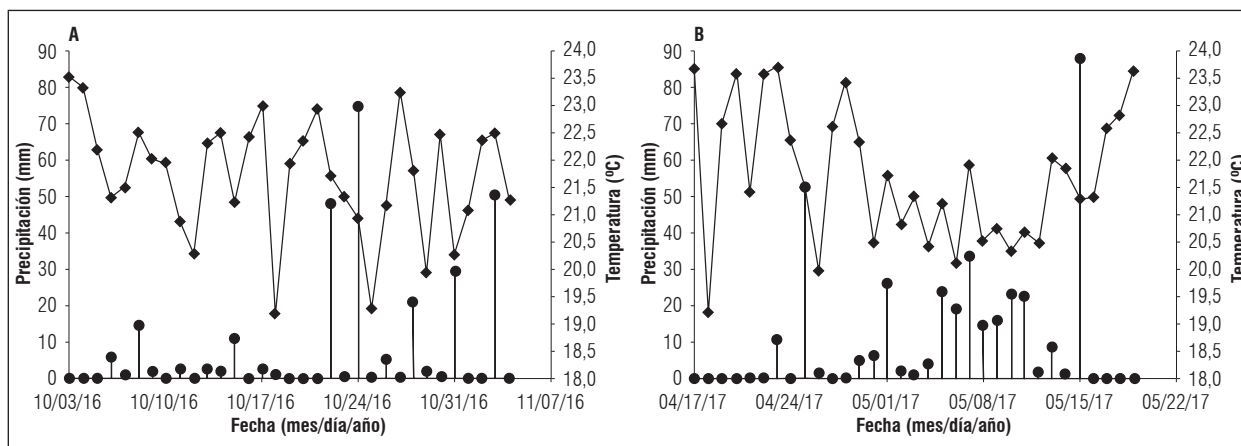
Tratamiento / Dosis	Producción c.c. (g)	Frutos caídos (g)	Peso de fruto (g)	Inmaduros (%)	Pintones (%)	Maduros (%)	Sobremaduros (%)
Acetato de potasio (KCH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ) (0,5% P/V)	4.260,8	553,0	1,97	0,6	7,1	24,9	66,1
Acetato de potasio (KCH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ) (1,0% P/V)	6.087,5	784,0	2,10	0,5	5,7	23,6	70,2
Acetato de potasio (KCH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ) (2,0% P/V)	5.308,3	582,7	2,08	0,7	5,2	25,0	69,5
Aminoetoxi-vinil-glicina (AVG) (25 µg L <sup>-1</sup> )	5.087,5	456,0	2,02	0,7	8,1	20,8	69,4
Aminoetoxi-vinil-glicina (AVG) (50 µg L <sup>-1</sup> )	7.029,2	646,3	2,01	0,9	5,5	18,2	75,9
Aminoetoxi-vinil-glicina (AVG) (100 µg L <sup>-1</sup> )	5.600,0	602,6	2,20	1,1	7,0	39,0*	52,9*
Ácido aminooxiacético (AOA) (1 mg L <sup>-1</sup> )	6.179,2	640,4	2,11	0,7	8,0	30,7	60,6
Ácido aminooxiacético (AOA) (5 mg L <sup>-1</sup> )	5.529,2	575,3	2,13	0,8	6,8	26,6	66,0
Ácido aminooxiacético (AOA) (10 mg L <sup>-1</sup> )	5.946,0	647,1	1,95	1,1	4,8	28,2	66,3
Ácido salicílico (AS) (1 mM)	6.300,0	709,1	2,18	0,7	8,5	37,6*	53,5*
Ácido salicílico (AS) (5 mM)	6.566,7	662,8	2,11	1,0	8,0	27,5	63,0
Ácido salicílico (AS) (10 mM)	5.441,7	594,6	2,04	0,6	7,2	25,5	66,7
Testigo absoluto	6.204,2	671,4	2,05	0,9	5,4	24,8	69,5
Promedio general	5.810,8	625,0	2,07	0,8	6,7	27,1	65,4
ANDEVA (Pr > F)	0,6052	0,6618	0,0247	0,3741	0,0171	0,0001	0,0004

\*: Dentro de la columna indica diferencias estadísticas respecto al testigo absoluto usando la prueba de Dunnett ( $P \leq 0,05$ ). c.c.: café cereza.

**Tabla 3. Efecto de la aplicación de cuatro inhibidores de etileno en café variedad Castillo® 4 semanas después de comenzar la recolección, en Buena Vista (Colombia) durante una cosecha secundaria (abril a mayo del 2017).**

Tratamiento / Dosis	Producción c.c. (g)	Frutos caídos (g)	Peso de fruto (g)	Inmaduros (%)	Pintones (%)	Maduros (%)	Sobremaduros (%)
Acetato de potasio (KCH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ) (0,5% P/V)	5.084,2	790,8	2,50	0,7	3,6	15,2	80,3
Acetato de potasio (KCH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ) (1,0% P/V)	4.610,8	892,5	2,37	0,6	4,0	12,4	83,0
Acetato de potasio (KCH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ) (2,0% P/V)	5.379,2	903,3	2,40	0,7	5,9	14,6	78,8
Aminoetoxi-vinil-glicina (AVG) (25 µg L <sup>-1</sup> )	4.035,8	895,8	2,42	0,7	4,1	14,0	81,2
Aminoetoxi-vinil-glicina (AVG) (50 µg L <sup>-1</sup> )	3.655,8	836,3	2,46	0,8	4,2	17,2	78,2
Aminoetoxi-vinil-glicina (AVG) (100 µg L <sup>-1</sup> )	3.591,7	702,5	2,44	0,7	4,0	16,0	79,3
Ácido aminooxiacético (AOA) (1 mg L <sup>-1</sup> )	3.765,8	957,1	2,46	0,5	3,7	18,7	76,4
Ácido aminooxiacético (AOA) (5 mg L <sup>-1</sup> )	3.852,5	720,0	2,50	0,6	4,5	13,3	81,6
Ácido aminooxiacético (AOA) (10 mg L <sup>-1</sup> )	3.465,8	504,2	2,44	0,5	4,5	18,6	76,5
Ácido salicílico (AS) (1 mM)	4.329,2	1054,2	2,37	0,4	4,8	14,4	80,4
Ácido salicílico (AS) (5 mM)	4.612,5	1025,8	2,51	0,7	5,4	18,6	75,7
Ácido salicílico (AS) (10 mM)	4.204,2	699,2	2,30	0,8	5,7	16,4	77,5
Testigo absoluto	4.569,2	972,1	2,55	0,7	5,0	15,8	79,0
Promedio general	4.242,8	842,6	2,44	0,6	4,6	15,8	79,1
ANDEVA (Pr > F)	0,245	0,275	0,402	0,752	0,175	0,514	0,629

\*: Dentro de la columna indica diferencias estadísticas respecto al testigo absoluto usando la prueba de Dunnett ( $P \leq 0,05$ ). c.c.: café cereza.



**Figura 1. Registro diario de la precipitación y temperatura en un cultivo de café variedad Castillo®, durante la cosecha principal (A. Octubre a noviembre del 2016) y la cosecha secundaria (B. Abril a mayo del 2017).**

testigos evaluados. De acuerdo con Dias *et al.* (2014), las precipitaciones frecuentes durante el periodo en que ocurre la maduración del fruto de café, alteran su desarrollo aumentando la caída natural de los frutos.

## CONCLUSIONES

En el presente estudio los inhibidores aminoetoxi-vinil-glicina ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y ácido salicílico (1 mM), lograron retardar el proceso de maduración natural de los frutos de café variedad Castillo® durante la cosecha principal. En la cosecha secundaria, la precipitación adicional posiblemente estimuló la maduración de los frutos o facilitó el lavado de los inhibidores, provocando que el desarrollo no se afectara. A futuro, se requieren más pruebas que definan las concentraciones, los tiempos de aplicación, los efectos sobre la calidad de la bebida e incluso sobre el desarrollo de los órganos vegetativos de la planta, a fin de integrar el uso de los inhibidores de etileno como una tecnología funcional para la caficultura colombiana.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia (FNC) y el Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé). Los autores agradecen a Sra L. Díaz Bejarano, por la revisión y aportes en la elaboración de este artículo. De igual manera al Sr. M. Franco Arcila y al personal de apoyo en la Estación Experimental Paraguacito por su valiosa colaboración.

**Conflicto de intereses:** el manuscrito fue preparado y revisado con la participación de los autores, quienes declaran no tener algún conflicto de interés que coloquen en riesgo la validez de los resultados aquí presentados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeles, F.B., P.W. Morgan y M.E. Saltveit. 1992. Ethylene in plant biology. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Arcila, J. 1975. Efecto del ethephon en la calidad de la bebida del café. *Rev. Cenicafé* 26(1), 49-52.
- Arcila, J., L. Buhr, H. Bleiholder, H. Hack, U. Meier y H. Wicke. 2002. Application of the extended BBCH scale for the description of the growth stages of coffee (*Coffea* spp.). *Ann. Appl. Biol.* 141(1), 19-27. Doi: 10.1111/j.1744-7348.2002.tb00191.x
- Arora, A. 2008. Biochemistry of flower senescence. pp. 51-85. En: Paliyath, G., D. Murr., A. Handa y S. Lurie (eds.). *Postharvest biology and technology of fruits, vegetables, and flowers*. Wiley-Blackwell Publishing, New Delhi, India.
- Balaguera, H.E., F.A. Salamanca, J.C. García y A. Herrera. 2014. Etileno y retardantes de la maduración en la poscosecha de productos agrícolas. Una revisión. *Rev. Colomb. Cienc. Hort.* 8(2), 302-313. Doi: 10.17584/rcch.2014v8i2.3222
- Berlanga-Reyes, D.I., V.M. Guerrero-Prieto y J.J. Ornelas-Paz. 2011. Productos alternativos a la aminoetoxi-vinilglicina para el control de la producción de etileno en manzana 'Golden Delicious'. *Tecnociencia* 5(2), 83-89.

- Burns, J.K. 2008. 1-Methylcyclopropene applications in preharvest systems: focus on citrus. *HortScience* 43(1), 112-114.
- Camayo, G.C., B. Chaves, J. Arcila y A. Jaramillo. 2003. Desarrollo floral del café y su relación con las condiciones climáticas de Chinchiná-Caldas. *Rev. Cenicafe* 54(1), 35-49.
- Champa, W.H., M.I.S. Gill, B.V.C. Mahajan y N.K. Arora. 2015. Preharvest salicylic acid treatments to improve quality and postharvest life of table grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. Flame Seedless. *J. Food Sci. Technol.* 52(6), 3607-3616. Doi: 10.1007/s13197-014-1422-7
- Dal Cin, V., M. Danesin, A. Botton, A. Boschetti, A. Dorigoni y A. Ramina. 2008. Ethylene and preharvest drop: the effect of AVG and NAA on fruit abscission in apple (*Malus domestica* L. Borkh). *Plant Growth Reg.* 56, 317-325. Doi: 10.1007/s10725-008-9312-5
- DaMatta, F.M., C.P. Ronchi, M. Maestri y R.S. Barros. 2007. Ecophysiology of coffee growth and production. *Braz. J. Plant Physiol.* 19(4), 485-510. Doi: 10.1590/S1677-04202007000400014
- Davies, C. y C. Böttcher. 2014. Other hormonal signals during ripening. pp. 202-216. En: Nath, P., M. Bouzayen, A.K. Mattoo y J.C. Pech. (eds.). *Fruit ripening: physiology, signalling and genomics*. CABI, Oxfordshire, UK. Doi: 10.1079/9781845939625.0048
- Davis, A.P., J. Tosh, N. Ruch y M.F. Fay. 2011. Growing coffee: *Psilanthus* (*Rubiaceae*) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Bot. J. Linn. Soc.* 167(4), 357-377. Doi: 10.1111/j.1095-8339.2011.01177.x
- Dias, R.E.B.A., F.M. da Silva, J.P. Cunha, R.C. Avelar y F.C. Fernandes. 2014. Eficiência da colheita mecanizada do café com uso do inibidor de biossíntese de etileno. *Coffee Sci.* 9(4), 527-536. Doi: 10.25186/cs.v9i4.746
- Giovannoni, J.J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell* 16(suppl. 1), S170-S180. Doi: 10.1105/tpc.019158
- Greene, D.W. 2005. Time of aminoethoxyvinylglycine application influences preharvest drop and fruit quality of 'McIntosh' apples. *HortScience* 40(7), 2056-2060.
- Guo, H. y J.R. Ecker. 2004. The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7(1), 40-49. Doi: 10.1016/j.pbi.2003.11.011
- ICO (International Coffee Organization). 2017. Trade statistics tables. En: [http://www.ico.org/trade\\_statistics.asp?section=Statistics](http://www.ico.org/trade_statistics.asp?section=Statistics); consulta: septiembre de 2017.
- Karlidag, H., E. Yildirim y M. Turan. 2009. Exogenous applications of salicylic acid affect quality and yield of strawberry grown under antifrost heated greenhouse conditions. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172(2), 270-276. Doi: 10.1002/jpln.200800058
- Kesari, R., P. Trivedi y P. Nath. 2007. Ethylene-induced ripening in banana evokes expression of defense and stress related genes in fruit tissue. *Postharvest Biol. Technol.* 46(2), 136-143. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.04.010
- Kraeva, E., C. Andary, A. Carbonneau y A. Deloire. 1998. Salicylic acid treatment of grape berries retards ripening. *Vitis* 37(3), 143-144.
- Lelièvre, J.M., A. Latchè, B. Jones, M. Bouzayen y J.C. Pech. 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiol. Plant.* 101(4), 727-739. Doi: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb01057.x
- Leslie, C.A. y R.J. Romani. 1988. Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid. *Plant Physiol.* 88, 833-837. Doi: 10.1104/pp.88.3.833
- Marín, S.M., J. Arcila, E.C. Montoya y C.E. Oliveros. 2003. Relación entre el estado de madurez del fruto del café y las características de beneficio, rendimiento y calidad de la bebida. *Rev. Cenicafe* 54(4), 297-315.
- Pereira, L.F.P., R.M. Galvao, A.K. Kobayashi, S.M.B. Cação y V.L.G. Esteves. 2005. Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. *Braz. J. Plant Physiol.* 17(3), 283-289. Doi: 10.1590/S1677-04202005000300002
- Pezzopane, J.R.M., T.D.J.G. Salva, V.B. de Lima y L.C. Fazuoli. 2012. Agrometeorological parameters for prediction of the maturation period of Arabica coffee cultivars. *Int. J. Biometeorol.* 56(5), 843-851. Doi: 10.1007/s00484-011-0486-6
- Puerta, G.I. 2000. Influencia de los granos de café cosechados verdes, en la calidad física y organoléptica de la bebida. *Rev. Cenicafe* 51(2), 136-150.
- Ságio, S.A., A.A. Lima, H.G. Barreto, C.H.S. de Carvalho, L.V. Paiva y A. Chalfun-Junior. 2013. Physiological and molecular analyses of early and late *Coffea arabica* cultivars at different stages of fruit ripening. *Acta Physiol. Plant.* 35(11), 3091-3098. Doi: 10.1007/s11738-013-1342-6
- Saltveit, M.E. 1999. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 15(3), 279-292. Doi: 10.1016/S0925-5214(98)00091-X
- SAS Institute. 2012. The SAS system for Windows. Release 9.4. Cary, NC, USA.
- Serek, M., E.J. Woltering, E.C. Sisler, S. Frello y S. Sriskandrajah. 2006. Controlling ethylene responses in flowers at the receptor level. *Biotechnol. Adv.* 24(4), 368-381. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.01.007
- Silva, R.A., S.N. Matsumoto, G. Marques, P.N. de Oliveira y L.S. de Oliveira. 2013. Efeito do Mathury® na maturação de frutos de café variedade Catuaí Vermelho. *Cascavel* 6(3), 66-74.

- Srivastava, K.M. y U.N. Dwivedi. 2000. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. *Plant Sci.* 158(1), 87-96. Doi: 10.1016/S0168-9452(00)00304-6
- Stroup, W.W. 2015. Rethinking the analysis of non-normal data in plant and soil science. *Agron. J.* 107(2), 811-827. Doi: 10.2134/agronj2013.0342
- Upegui, G. y G. Valencia. 1972. Anticipación de la maduración de la cosecha de café, con aplicaciones de Ethrel. *Rev. Cenicafé* 23(1), 19-26.
- Wang, Y.Y., B.Q. Li, G.Z. Qin, L. Li y S.P. Tian. 2011. Defense response of tomato fruit at different maturity stages to salicylic acid and ethephon. *Sci. Hort.* 129(2), 183-188. Doi: 10.1016/j.scienta.2011.03.021
- Wills, R. y M. Warton. 2004. Efficacy of potassium permanganate impregnated into alumina beads to reduce atmospheric ethylene. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 129(3), 433-438.
- Winston, E.C., M. Houlst, C.J. Howitt y R.K. Shepherd. 1992. Ethylene-induced fruit ripening in arabica coffee (*Coffea arabica* L.). *Aust. J. Exp. Agr.* 32(3), 401-408. Doi: 10.1071/EA9920401
- Yildiz, K., B. Ozturk e Y. Ozkan. 2012. Effects of aminoethoxyvinylglycine (AVG) on preharvest fruit drop, fruit maturity, and quality of 'Red Chief' apple. *Sci. Hortic.* 144, 121-124. Doi: 10.1016/j.scienta.2012.07.005



# Leaf area and intermittent misting on hop plants propagation by stem cuttings

## Área foliar y nebulización intermitente en la propagación de lúpulo por estacas de tallo

ERIK NUNES GOMES<sup>1, 3</sup>  
MARÍLIA PEREIRA MACHADO<sup>2</sup>  
JOSÉ MIOLA<sup>2</sup>  
CÍCERO DESCHAMPS<sup>2</sup>

Hop plants (cv. Chinook) stock plants grown in field conditions at Southern Brazil.

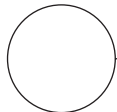
Photo: M.P. Machado



### ABSTRACT

Hop (*Humulus lupulus* L.) is a plant with economic importance due to its use in the brewing industry. The cones produced by the species contain the main substances responsible for the beer's bitterness and aroma. Hop plants cultivation in Brazil is still incipient and information on efficient methods for its propagation in this context are scarce. The objective of the present study was to evaluate the effect of different leaf areas (two whole leaves, two leaves in half, one whole leaf, one leaf in half and without leaves) in herbaceous stem cuttings planted in environments with and without intermittent misting. The experiment was conducted in a greenhouse in Curitiba-PR, Brazil (25°25'40 "S and 49°16'23" W). After 30 days of planting, the survival, rooting, sprouting and leaf retention percentages, roots number, average roots length and roots and sprouts dry mass were evaluated. Cuttings with one or two whole leaves and two leaves in half in the misting environment showed the highest rooting percentages (between 90.0 and 97.5%). In the without misting environment, the highest values were observed in cuttings with one or two leaves in half and one whole leaf (between 62.5 and 72.5%). Leafless cuttings had low survival percentages (2.5% in both environments). Under intermittent misting conditions it is recommended to prepare stem cuttings with one or two whole leaves and, in the absence of control over the environment humidity, cuttings with one whole leaf are recommended.

**Additional key words:** *Humulus lupulus*, Chinook, asexual reproduction, rooting, growth environments, transpiration.



<sup>1</sup> Department of Plant Biology and Plant Pathology at Rutgers, The State University of New Jersey, New Brunswick-NJ (USA). ORCID Gomes, E.N.: 0000-0002-7999-070X

<sup>2</sup> Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR (Brazil). ORCID Machado, M.P.: 0000-0002-3209-4780; ORCID Miola, J.: 0000-0003-4264-2792; ORCID Deschamps, C.: 0000-0003-0786-0532

<sup>3</sup> Corresponding author. [e93gomes@gmail.com](mailto:e93gomes@gmail.com)

## RESUMEN

Lúpulo (*Humulus lupulus* L.) es una planta con una economía importante debido a su uso en la industria cervecera. Los conos producidos por esta especie contienen las principales sustancias responsables de la amargura y el aroma de la cerveza. El cultivo de plantas de lúpulo en Brasil es aún incipiente en la información y los métodos eficientes para su propagación son escasos en este contexto. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de las diferentes áreas de hoja (dos hojas enteras, dos hojas a la mitad, una hoja entera, una hoja a la mitad y estacas sin hojas) en estacas herbáceas plantadas en ambientes con y sin nebulización intermitente. El experimento fue conducido en un invernadero en la ciudad de Curitiba-PR, Brasil (25°25'40 "S y 49°16'23" W). Después de 30 días se evaluaron los porcentajes de supervivencia, enraizamiento, brotación y retención de hojas, número de raíces, longitud promedio de raíces y masa seca de raíces y brotes. Las estacas con una o dos hojas enteras y dos hojas a la mitad, bajo nebulización, mostraron los porcentajes de enraizamiento más altos (entre 90 y 97,5%). En el ambiente sin niebla, los valores más altos se observaron en los esquejes con una o dos hojas por la mitad y una hoja entera (entre 62,5 y 72,5%). Las estacas sin hojas tuvieron bajos porcentajes de supervivencia (2,5% en ambos ambientes). Bajo condiciones de neblina intermitente, se recomienda preparar esquejes de tallo con una o dos hojas enteras y, sin nebulización, se recomiendan esquejes con una hoja entera.

**Palabras clave:** *Humulus lupulus*, Chinook, reproducción asexual, enraizamiento, ambientes de crecimiento, transpiración.

Received for publication: 10-01-2018 Accepted for publication: 30-05-2018

## INTRODUCTION

*Humulus lupulus* L., the hop plant, is a perennial, herbaceous, dioecious and rhizomatous species, belonging to the Canabaceae family. Its development is characterized by emitting new shoots from rhizomes in the Spring and by reaching from 6 to 9 m in height, needing support in order to sustain its growth. It blooms in late summer, matures the flowers and begins the senescence in the autumn, when it loses all the aerial parts (Koetter and Biendl, 2010; Almaguer *et al.*, 2014). The female flowers commonly called hops, are located in strobiles with rounded shape (cones). These cones hold glandular trichomes that store the major substances of commercial importance in the species (Almaguer *et al.*, 2014). Around the world, the brewing industry uses *H. lupulus* L. flowers as an essential component in the brewing process, as they are responsible for their bitterness and aroma (Silva and Faria, 2008; Nance and Setzer, 2011).

Because it is a dioecious plant, *H. lupulus* L. is highly heterozygous, so the populations obtained by seeds are strongly variable, losing the characteristics that provide the commercial value from the cultivar that originated them. Therefore, for commercial purposes, *H. lupulus* L. is propagated vegetatively, both from rhizomes and herbaceous cuttings

(DeNoma, 2000), in order to maintain the characteristics of the cultivars.

Among the factors that influence the adventitious rooting of stem cuttings, the presence of leaves is one of the most important because it has a promoter effect at the beginning of root formation and roots development (Solis *et al.*, 2017). In *H. lupulus* L., the success of leafy stem cuttings in rooting is probably associated with their ability to accumulate carbohydrates during the rooting period through photosynthesis (Howard, 1965). Rooting of stem cuttings is also influenced by endogenous auxin produced in the leaves and buds (Bona and Biasi, 2010; Dias *et al.*, 2015).

In addition, the rooting of cuttings depends on environmental factors to maintain the water balance in plant tissues. Intermittent misting is a widely used tool in vegetative propagation because it reduces the air temperature and the rate of transpiration by maintaining a film of water over the cuttings (Sousa *et al.*, 2013). However, where the structure necessary to provide the adequate environmental conditions for the cuttings is not available, alternatives must be indicated.

The objective of the present study was to evaluate the rooting of *H. lupulus* L. cv. Chinook stem cuttings with different leaf areas in environments with and without intermittent misting.

## MATERIAL AND METHODS

The experiment was conducted in a greenhouse at the Department of Phytotechnology and Phytosanitaryism of the Agrarian Sciences Sector of the Federal University of Parana, in the city of Curitiba-PR, Brazil (25°25'40" S and 49°16'23" W).

The *Humulus lupulus* stem cuttings were collected from the apical segment of 10 two years old Chinook cultivar stock plants. The stock plants were cultivated in pots under greenhouse conditions at the Center of Experimental Stations of Canguiri (CEEx, Federal University of Parana), municipality of Pinhais-PR, Brazil (25°23'30" S and 49°07'30" W, 930 m a.s.l.). The plant material (branches with leaves) was collected in May 2017 in the morning period, moistened and placed in a polystyrene box for transportation to the greenhouse where the cuttings were made.

The herbaceous stem cuttings were made with  $0.5 \pm 0.1$  cm diameter,  $5 \pm 2$  cm in length, with a diagonal (bevel) cut at the base and a straight cut at the apex. The cuttings were prepared with different leaf areas corresponding to the treatments: two whole leaves in the apical region, two leaves reduced to half of its original area, one whole leaf, one leaf reduced to half of its original area, and leafless cuttings. The stem cuttings have not undergone any type of sanitary treatment or plant growth regulators application. After cuttings preparation, they were immediately planted in polystyrene trays containing 128 cells ( $40 \text{ cm}^3$  per cell) filled with Tropstrato HT® commercial substrate.

The cuttings were conducted under two different environments in the same greenhouse: (1) intermittent misting chamber (5 s every 30 min) and (2) no intermittent misting. In the without misting environment, the cuttings were irrigated manually with 700 mL of water per tray, twice a week.

The experimental design was completely randomized in a  $5 \times 2$  factorial arrangement (five leaf areas and two rooting environments). The experiment had four replications and the experimental units consisted of 10 cuttings, totaling 400 cuttings in the experiment.

After 30 d of planting, the survival, rooting, sprouting and leaf retention percentages, roots number, average roots length and roots and sprouts dry mass were evaluated. Data were submitted to variance homogeneity analysis by the Bartlett's test, ANOVA variance analysis and, when significant, the means were compared by Tukey's test at 5% probability. The Assistat statistical software (Silva and Azevedo, 2016) was used to perform the analyses.

## RESULTS AND DISCUSSION

According to variance analysis, there was an interaction effect ( $P \leq 0.01$ ) for survival, rooting and sprouting percentages. Considering the factors alone, the leaf area factor was significant for leaf retention percentage, roots number, average roots length and roots and sprouts dry mass. The misting factor influenced the leaf retention percentage, roots number, average roots length (Tab. 1 and 2).

The cuttings survival and rooting ranged from 97.5 to 2.5%. The sprouting percentage varied from 85 to 2.5%. Stem cuttings with two whole leaves, two leaves in half and one whole leaf did not differ in the environment with intermittent misting. In the non-misting environment, cuttings with two leaves in half and one whole leaf were superior to those with two whole leaves for survival and rooting variables (Tab. 1).

Stem cuttings with two whole leaves without intermittent misting had their performance reduced, probably due to excessive transpiration, which caused its death. The loss of water due to transpiration and low roots quality are among the main causes of death in herbaceous cuttings. Loss of water through the leaves can lead to a state of desiccation, impacting their survival (Pacheco and Franco, 2008). The control of transpiration provided by misting may explain the best performance of cuttings with two whole leaves in this environment.

Humidity is one of the key external factors to stimulate the rooting of stem cuttings (Amaral *et al.*, 2012). Thus, control over humidity in the environment may result in improved survival and rooting (Braun *et al.*, 2010). The use of intermittent misting has been recommended to reduce air temperature and transpiration rate, since it allows the maintenance of water film on the cuttings (Sousa *et al.*, 2013). The results of hop cuttings observed in present study are similar

**Table 1. Stem cuttings survival, rooting and sprouting percentages in *Humulus lupulus* cv. Chinook with different leaf areas and presence/absence of intermittent misting. Curitiba-PR, Brazil (2017).**

Leaf areas	Survival (%)		Rooting (%)		Sprouting (%)	
	Intermittent misting					
	Misting	Non-misting	Misting	Non-misting	Misting	Non-misting
2 whole leaves	92.5 aA	52.5 bB	92.5 aA	45.0 bB	85.0 aA	50.0 aB
2 half leaves	90.0 aA	72.5 aB	90.0 aA	72.5 aB	85.0 aA	67.5 aB
1 whole leaf	97.5 aA	70.0 aB	97.5 aA	70.0 aB	82.5 aA	70.0 aA
1 half leaf	75.0 bA	62.5 abB	75.0 bA	62.5 aB	52.5 bA	62.5 aA
Leafless cutting	2.5 cA	2.5 cA	2.5 cA	2.5 cA	2.5 cA	2.5 bA
CV (%)	11.16		10.58		19.58	

Means followed by the same lowercase letter in the columns and upper case in the rows do not differ from each other by the Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ). CV: coefficient of variation.

**Table 2. Leaf maintenance, roots number, average roots length, roots dry mass and sprouts dry mass in *Humulus lupulus* cv. Chinook herbaceous stem cuttings with different leaf areas and in the presence/absence of intermittent misting in rooting environments. Curitiba-PR, Brazil (2017).**

Leaf area	Variable	2 whole leaves	2 half leaves	1 whole leaf	1 half leaf	Leafless cuttings	CV (%)
	Leaf maintenance (%)		67,5 ab	75,0 a	71,25 ab	55,0 b	-
Roots number		21,1 a	17,67 ab	17,04 ab	14,96 b	0,63 c	26.21
Roots length (cm)		5,77 a	5,02 a	4,81 a	5,06 a	0,31 b	28.44
Roots dry mass (mg)		39,60 a	32,67 ab	22,53 ab	16,40 bc	2,88 c	54.69
Sprouts dry mass (mg)		41,39 a	30,34 a	34,63 a	38,02 a	3,00 b	51.08
Environments	Variable	Misting		Non-misting			
	Leaf maintenance (%)	81,25 a		53,12 b			20.66
	Roots number	16,21 a		12,35 b			26.21
	Roots length (cm)	4,58 a		3,80 b			28.44
	Roots dry mass (mg) <sup>ns</sup>	22,84		22,79			54.69
	Sprouts dry mass (mg) <sup>ns</sup>	25,19		33,77			51.08

Means followed by different letters in the rows differ by the Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ). ns: non-significant. CV: coefficient of variation.

to those reported for herbaceous *Cuphea calophylla* stem cuttings, where misting allowed the advantageous effect of leaves for rooting to not be overcome by the adverse effects related to the excess of transpiration (Lusa and Biasi, 2011).

In conditions where the environment humidity control is not possible, however, the reduction of leaf area in hops stem cuttings may be important. The technique of leaf area reduction in cuttings has as main objective to avoid the "umbrella" effect, which may impair irrigation efficiency, and to avoid excessive transpiration (Santana *et al.*, 2010; Correia *et al.*, 2015). In *Plukenetia polyadenia* stem cuttings, the leaf

area reduction by 50% allowed to reach the best balance between the transpiration disadvantages and the photosynthesis advantages, the authors emphasize, however, that the optimal leaf area for rooting is variable according to different species (Solis *et al.*, 2017). According to the present study, for hop cuttings, the optimum leaf area is also variable according to the rooting environment.

In the environment without misting, the use of cuttings with one whole leaf had the same effect of the use of two leaves in half, both being superior to the cuttings with two whole leaves. This response has important agronomic implications, since the use of

an entire leaf in detriment of two leaves in half can be technically advantageous by the reduction of the time and labor in cuttings production (Santana *et al.*, 2010). In addition, the preparation of cuttings with whole leaves reduces the risk of contamination by microorganisms due to the absence of lesions (Dias *et al.*, 2015).

Regardless of the environment, the leafless cuttings had the lowest values of survival and rooting. Early root formation is hormonally controlled and the reserves present in the cuttings and photoassimilates produced in the leaves influence its development (Solis *et al.*, 2017). Root initiation and development are dependent on auxins, carbohydrates, nitrogen compounds and rooting cofactors that are supplied by the leaves and accumulate cutting base, in this sense, as a general rule, the presence of leaves is important when used herbaceous or semi-hardwood cuttings for plant propagation (Bona and Biasi, 2010). In a previous experiment with hop herbaceous cuttings, the presence of leaves was associated with the ability to accumulate carbohydrates and to stimulate rooting especially in conditions of intermittent misting and high light intensity (Howard, 1965).

In the present study the environment with misting, in general, promoted higher values of survival, sprouting and rooting, except in leafless cuttings. Cuttings with one leaf in half, in the misting environment, presented values markedly inferior to the others, except the treatment composed by leafless cuttings (Tab. 1). Without misting, cuttings with a leaf in half showed greater rooting percentages than cuttings with two whole leaves, demonstrating that in this environment the main limiting factor was the transpiration and not the reserves supplied to the cuttings base.

For the sprouting percentage, in the without misting environment, all types of cuttings were superior to the leafless cuttings. Under misting, cuttings with two whole leaves, two leaves in half and c with one whole leaf were superior to those with one leaf in half, which, in turn, was superior to the leafless cuttings. The inferiority of sprouting percentage and sprouts dry mass in leafless cuttings (Tab. 2) is related, similarly to rooting, to leaves function in photosynthesis and availability of carbohydrates to the cuttings (Solis *et al.*, 2017).

Leaf retention in cuttings with two leaves in half was superior to cuttings with one leaf in half. The

other treatments did not differ from each other. For the roots number, cuttings with two whole leaves presented better performance than those with one leaf in half. All the cuttings with the maintenance of some fraction of the leaf area showed a greater number of roots compared to the leafless cuttings. Roots length was also lower in the leafless cuttings and there was no difference between the other treatments, similar to that observed for sprouts dry mass. For the roots dry mass, leafless cuttings and cuttings with one leaf in half were inferior to cuttings with two whole leaves (Tab. 2).

In eucalyptus mini-cuttings, similar to the observed in hop plant cuttings, there is a positive relation between leaf area and rizogenic capacity, including rooting rate, root number and root biomass (Correia *et al.*, 2015). In the case of medicinal and aromatic species such as *Cuphea calophylla* (Lusa and Biasi, 2011), *Pogostemon cablin* (Garbuió *et al.*, 2007), *Lavandula dentata* (Bona and Biasi, 2010) and *Plukenetia polyadenia* (Solis *et al.*, 2017), among others, the presence of leaves on cuttings was also positively related to rooting and root system vigor.

Regarding the rooting environment, the presence of misting promoted higher values of leaf retention, number of roots and average roots length (Tab. 2). In addition to higher mortality, the worst rooting and roots vigor in stem cuttings with damage to water relations may also be related to the lower displacement of auxins due to low water content (Pizzatto *et al.*, 2011).

## CONCLUSION

*Humulus lupulus* cv. Chinook propagation by stem cutting is feasible, reaching rooting percentages up to 97.5% without plant growth regulators use. Leafless stem cuttings are not recommended for hop plant propagation. Under intermittent misting conditions it is recommended the use of cuttings with one or two whole leaves and, in the absence of control over the environment humidity, cuttings with one whole leaf are recommended. The use of intermittent misting in the rooting environment allows higher percentages of survival, rooting, sprouting and greater vigor of the root system in hop plant herbaceous stem cuttings. Further studies are recommended to evaluate the adaptation of plants propagated by stem cuttings under Brazilian cultivation conditions.



## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) by sponsorship of the research and doctorate scholarship granted to the first author.

**Conflict of interests:** the manuscript was prepared and reviewed with the participation of the authors, who declare that there exists no conflict of interest that puts in risk the validity of the presented results.

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Almaguer, C., C. Schonberger, M. Gastl, E.K. Arendt, and T. Becker. 2014. *Humulus lupulus* – a story that begs to be told. A review. *J. Brew. Distilling* 120(4), 289-314. Doi: 10.1002/jib.160
- Amaral, G.C., L.P.D.S. Brito, R.C. Avelino, J.V.D. Silva Júnior, M.Z. Beckmann-Cavalcante, and I.H.L. Cavalcante. 2012. Produção de mudas de *Duranta repens* L. pelo processo de estaquia. *Rev. Cienc. Agr.* 35(1), 134-142.
- Bona, C.M.D. and L.A. Biasi. 2010. Influence of leaf retention on cutting propagation of *Lavandula dentata* L. *Rev. Ceres* 57(4), 526-529. Doi: 10.1590/S0034-737X2010000400014
- Braun, H., P.C. Cavatte, J.A. Teixeira do Amaral, J.F. Teixeira do Amaral, and E.F. Reis. 2010. Produção de mudas de tomateiro por estaquia: efeito do substrato e comprimento de estacas. *Idesia* 28(1), 9-15. Doi: 10.4067/S0718-34292010000100002
- Correia, A.C.G., A. Xavier, P.C. Dias, M. Titon, and R.C. Santana. 2015. Redução foliar em miniestacas e microestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. *Rev. Árvore* 39(2), 295-304. Doi: 10.1590/0100-67622015000200009
- DeNoma, J.S. 2000. *Humulus* genetic resources: Hop. USDA ARS National Clonal Germplasm repository. USDA ARS National Clonal Germplasm Repository. In: <https://www.ars.usda.gov/pacific-west-area/corvallis-or/national-clonal-germplasm-repository/docs/ncgr-corrallis-humulus-germplasm>; consulted: July, 2017.
- Dias, P.C., A. Xavier, L. Silva de Oliveira, A.C. Guieiro Correia, and G.A. Barbosa. 2015. Tipo de miniestaca e de substrato na propagação vegetativa de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan). *Cienc. Florestal* 25(4), 909-919. Doi: 10.5902/1980509820593
- Garbuio, C., L.A. Biasi, A.P.D.J. Kowalski, D. Signor, E.M. Machado, and C. Deschamps. 2007. Propagação por estaquia em patchouli com diferentes números de folhas e tipos de estacas. *Scientia Agr.* 8(4), 435-438. Doi: 10.5380/rsa.v8i4.9893
- Howard, B.H. 1965. Regeneration of the hop plant (*Humulus lupulus* L.) from softwood cuttings. I. the cutting and its rooting environment. *J. Hortic. Sci.* 40(1), 181-191. Doi: 10.1080/00221589.1965.11514132.
- Koetter, U. and M. Biendl. 2010. Hops (*Humulus lupulus*): A review of its historic and medicinal uses. *J. Am. Bot. Council* 87(1), 44-57.
- Lusa, M.G. and L.A. Biasi. 2011. Estaquia de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon* (Koehne) Lourteig (Lythraceae). *Rev. Bras. Pl. Med.* 13(1), 52-57. Doi: 10.1590/S1516-05722011000100008
- Nance, M.R. and W.N. Setzer. 2011. Volatile components of aroma hops (*Humulus lupulus* L.) commonly used in beer brewing. *J. Brew. Distilling* 2(2), 16-22.
- Pacheco, J.P. and E.T.H. Franco. 2008. Substratos e estacas com e sem folhas no enraizamento de *Luehea divaricata* Mart. *Cienc. Rural* 38(7), 1900-1906. Doi: 10.1590/S0103-84782008000700015
- Pizzatto, M., A. Wagner Júnior, D. Luckmann, K. Piro-la, D.A. Cassol, and S.M. Mazaró. 2011. Influência do uso de AIB, época de coleta e tamanho de estaca na propagação vegetativa de hibisco por estaquia. *Rev. Ceres* 58(4), 487-492. Doi: 10.1590/S0103-84782008000700015
- Santana, R.C., T.R. Dutra, J.P. Carvalho Neto, G.S. Nogueira, P.H. Graziotti, and N.F.D. Barros Filho. 2010. Influence of leaf area reduction on clonal production of eucalyptus seedlings. *Cerne* 16(3), 251-257. Doi: 10.1590/S0104-77602010000300001
- Silva, F.D.A.S. and C.A.V. Azevedo. 2016. Comparison of means of agricultural experimentation data through different tests using the software Assisat. *Afr. J. Agric. Res.* 11(1), 3527-3531. Doi: 10.5897/AJAR2016.11522
- Silva, P.H.A. and F.C. Faria. 2008. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 28(4), 902-906. Doi: 10.1590/S0101-20612008000400021
- Solis, R., M. Pezo, G. Diaz, L. Arévalo, and D. Cachique. 2017. Vegetative propagation of *Plukenetia polyadenia* by cuttings: effects of leaf area and indole-3-butyric acid concentration. *Braz. J. Biol.* 77(3), 580-584. 10.1590/1519-6984.20415
- Sousa, C.M., R.N. Busquet, M.A.D.S. Vasconcellos, and R.M. Miranda. 2013. Effects of auxin and misting on the rooting of herbaceous and hardwood cuttings from the fig tree. *Rev. Cienc. Agron.* 44(2), 334-338. Doi: 10.1590/S1806-66902013000200016

## SCIENTIFIC NOTE

# Development and root morphology of passion fruit in different substrates

## Desarrollo y morfología de la raíz del maracuyá en diferentes substratos

KARMINNE DIAS DO VALLE<sup>1, 3</sup>

LAÍSSE DANIELLE PEREIRA<sup>1</sup>

MOAB ACÁCIO BARBOSA<sup>1</sup>

VANESSA BRENDA SOUZA CHAVES<sup>1</sup>

PEDRO HENRIQUE MAGALHÃES DE SOUZA<sup>1</sup>

EDÉSIO FIALHO DOS REIS<sup>1</sup>

ALEJANDRO HURTADO-SALAZAR<sup>2</sup>

DANIELLE FABIOLA PEREIRA DA SILVA<sup>1</sup>

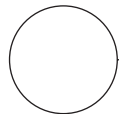


Passion fruit nursery.

Photo: K.D.d. Valle

### ABSTRACT

Among the factors that contribute to better initial development of plants, it is the substrate used. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of substrate in initial formation and morphology of the roots of two species of passion fruits. The analyses were done in the nursery of the Federal University of Goiás (UFG), Regional Jataí, Brazil, with a light interception of 60%. The material used were seeds of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) and the cultivar FB 200 (Flora Brasil), harvested in the UFG experimental field. They were sown in three types of substrates: Soil I (mixture of soil, chicken manure and sand in a ratio of 2:1:1 by volume), soil II (steep bank), and Bioplant<sup>®</sup>, using for plants perforated bags with a capacity of 1.5 L. The experimental design was a completely randomized design with six treatments, eight replications and four plants per plot. After 30 days of sowing, fresh matter of root, root dry matter and morphology were evaluated. The substrate affected the initial development of yellow passion fruit, obtaining the best results with Bioplant<sup>®</sup>, showing as promising for the development of all the evaluated characteristics.



**Additional key words:** *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, growth, propagation, fruit crops, obtaining of seedlings.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, Jataí-GO (Brazil). ORCID Valle, K.D.d.: 0000-0002-4020-4169; ORCID Pereira, L.D.: 0000-0002-2977-3870; ORCID Barbosa, M.A.: 0000-0001-6937-5642; ORCID Chaves, V.B.S.: 0000-0001-7159-334X; ORCID Souza, P.H.M.d.: 0000-0002-4824-0738; ORCID Reis, E.F.d.: 0000-0002-8000-3513; ORCID Silva, D.F.P.d.: 0000-0001-7366-5650

<sup>2</sup> Department of Agricultural Production, Universidad de Caldas, Manizales (Colombia). ORCID Hurtado-Salazar, A.: 0000-0002-1251-125X

<sup>3</sup> Corresponding author. [karminnevalle@gmail.com](mailto:karminnevalle@gmail.com)

## RESUMEN

Entre los factores que contribuyen para un correcto desarrollo inicial de las plantas, está el sustrato utilizado, por tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del sustrato en la formación inicial y morfología de las raíces de dos especies de maracuyá. El experimento fue realizado en vivero con polisombra de interceptación luminosa (60%), en la Universidad Federal de Goiás (UFG), Regional Jataí, Brasil. Los materiales utilizados fueron maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) y el cultivar FB 200 (Flora Brasil). Se utilizaron semillas de frutos recolectados del huerto experimental de la UFG. Se sembraron en tres tipos de sustratos: Suelo I (mezcla de 2 partes de suelo + 1 parte de gallinaza + 1 parte de arena), Suelo II (suelo de barranco) y Bioplant®; se utilizó bolsas perforadas para plántulas con capacidad de 1,5 L. El diseño experimental utilizado fue completamente aleatorio con seis tratamientos, ocho repeticiones y cuatro plántulas por parcela. Después de 30 días de siembra, se evaluó: peso fresco de la raíz, peso seco de raíz y morfología de la raíz. El sustrato tuvo efecto en el desarrollo inicial de las plantas de maracuyá, donde se obtuvo los mejores resultados con Bioplant®. Este sustrato sobresalió en todas las características evaluadas mostrando su potencialidad en la propagación de esta especie.

**Palabras clave adicionales:** *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, crecimiento, propagación, frutales, obtención de plántulas.

Received for publication: 26-02-2018 Accepted for publication: 30-05-2018

## INTRODUCTION

In recent years, the demand for food is increasing and this situation will continue as a progressive function of population growth. Therefore, the need to produce efficiently, with quality and low costs are growing. The basis for the production lies in obtaining of quality seedlings. With this, the high productivity of quality fruits is directly linked to the use of good techniques for raising of seedlings, because they need to be vigorous for a better capacity of adaptation and resistance to climatic conditions. Zaccheo *et al.* (2013) found that 60% of the success of a plant culture depends on quality seedlings.

The cultivation of passion fruits became increasing both by favorable climatic conditions, as well as the acceptability for the industry in the form of pulp (Meletti, 2011). By leveraging the diversification, the culture of passion fruit has been occupying a prominent place for small farms, as an alternative agricultural fast economic return.

The propagation of this fruit is usually done through seeds (Meletti, 2011) however this can also be performed by means of cuttings and grafting (Leonel and Pedroso, 2005). Even when propagated by sexual, presents characteristics of early fruiting, which reason the vegetative propagation is not strictly necessary to reduce the period of juvenility of the plant.

Roncatto *et al.* (2008) pointed out the importance of conducting seedlings into individual containers, because such practice provides greater precocity and reduction of possible contamination by pathogens. In addition to the types of container, several factors also influence the final quality of changes, such as quality and seed health, crop management such as irrigation and fertilization, and technologies for example types of protected environments (Lima *et al.*, 2016).

According to Lima *et al.* (2016) different studies with pure commercial substrate Plantmax® and/or in mixture with manure, soil and vermiculite have provided high quality passion fruit seedlings. Negreiros *et al.* (2004) observed that the use of Plantmax® and the substrate composed of sand, vermiculite, manure (1:1:1), supplemented with 10 kg m<sup>-3</sup> of single superphosphate, 6 kg m<sup>-3</sup> of potassium chloride, 2 kg m<sup>-3</sup> of urea and 8 kg m<sup>-3</sup> of limestone promoted a higher percentage of germination and adequate development of passion fruit seedlings.

The use of suitable substrates and the addition of formulations in the current system of production is considered beneficial. For that to happen and bring reduction in the final costs is necessary to mix different components to obtain a suitable substrate (Almeida *et al.*, 2014).

In view of the foregoing and showing to find the best substrate for seedling production, the present aimed to evaluate the development and the morphology of the root system of passion fruit plants, using three types of substrate.

## MATERIAL AND METHODS

The experiment was carried out in the nursery (with light interception of 60%) of the Federal University of Goiás, Regional Jataí, Jataí-GO, Brazil. This experimental nursery is located at 17°55' S and 51°43' W. According to the classification of Köppen, the climate of the region is the Aw type, megatérmic, with a defined dry season from May to September and the rainy season from October to April. The average temperature is 23.3°C and the average annual rainfall 1,541 mm (Cardoso *et al.*, 2014).

Seeds of yellow passion fruit (*P. edulis* f. *flavicarpa*) and FB 200 Flora (Brazil), removed from fruits harvested from experimental arrays of orchards, were selected from fruits of healthy plants, free of pests and diseases. Fruits were harvested manually with pruning shears, using as a criterion of harvest stage the yellow color of the epidermis.

Once harvested, the fruits were sectioned and the mucilage with the seeds were removed by means of water + quicklime. Subsequently, the seeds were placed in polyethylene sieve and washed in running water.

After taking off from these seeds were sown using three seeds per bag at 1.0 cm depths in three types of substrates (Soil I; Soil II and Bioplant®), using perforated bags for plants with a capacity of 1.5 L. After germination, which occurred 15 days after sowing (das), the seedlings were thinned out leaving only the most vigorous one.

According to the manufacturer, the Bioplant® is composed of coconut fiber, bark of pinus, dung, sawdust, vermiculite, carbonized rice, peat of sphagnum, gypsum, calcium carbonate, magnesium, magnesium thermophosphate (yoorin) and additives (fertilizer), made by Bioplant Agrícola Ltda., Nova Ponte-MG, Brazil. The Soil I is mixed by 2 parts of soil + 1 part of chicken manure + 1 part of sand (2:1:1, by volume), whose mixture had a pH (CaCl<sub>2</sub>) of 5.3; P of 21.9 mg dm<sup>-3</sup>; K of 1.10 cmolc dm<sup>-3</sup> and Mg of 0.57 cmolc dm<sup>-3</sup>, without any correction in the mixture itself. The

Soil II was characterized with a pH (CaCl<sub>2</sub>) of 5.9, P of 3.0 mg dm<sup>-3</sup>; K of 0.02 cmolc dm<sup>-3</sup> and Mg of 0.14 cmolc dm<sup>-3</sup>, which was corrected in accordance with the needs of the culture.

The following parameters were evaluated at 35, 40, 45, 50 and 55 das: fresh root matter (FRM), root dry matter (RDM) and root morphology.

At 30 das, contents of FRM and RDM were evaluated of normal seedlings, where the parts (roots and aerial parts) were separated. The roots were washed and weighed individually with a precision electronic scale of 0.1 g. Afterwards, they were subjected to drying in an oven at 70°C for 24 h, to obtain the dry matter (g), according to the methodology described by Nakagawa (1999).

The experimental design was a completely randomized design with six treatments, eight replications and four plants per plot. The averages of the analyzed variables were compared by the Tukey test at 5% probability. The calculations concerning the statistical analyzes were performed using the statistical software SAS (Statistical Analysis System, 2002). For the quantitative data a regression analysis (Gomes, 2000) was applied. In order to describe better the root development, a morphological analysis was made, by means of image comparison.

## RESULTS AND DISCUSSION

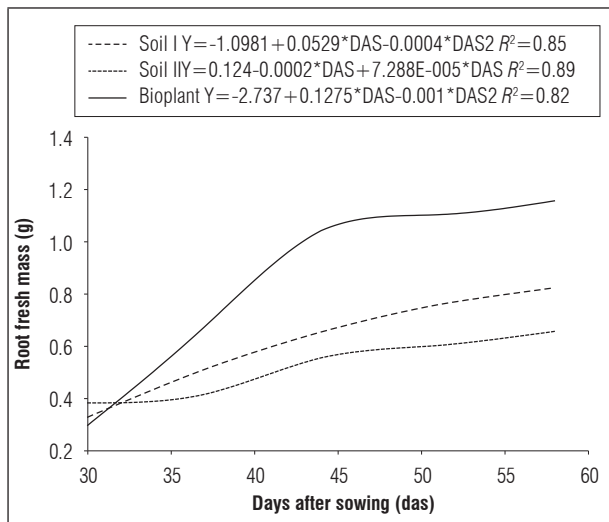
The passion fruit seedlings showed variations in growth, influenced by the substrate. At 30 das, the cultivar FB 200 presented a higher initial performance in Soil II, with a RFM of 0.1833 g, and the exponential equation that fit best. For Soil I and Bioplant® the measured results of RFM and RDM of FB200 seedlings adjusted to the quadratic model, in response to the variation of time (Fig. 1).

At 35, 40, 45, 50 and 55 das, a higher development of plants, cultivated in Bioplant® substrate was observed (Fig. 1). These results are due to the fact that the commercial substrate probably gathers physical, chemical and biological characteristics which are appropriate and well balanced, that influenced positively the weight gain and the morphology of plants, highlighting the importance of the substrate on the quality in the seedlings production (Fig. 2).



Differences were observed in the morphology and the formation of the root system, where the roots, developed in the Bioplant® substrate showed a higher branching and also were larger (Fig. 2). Roots in Soil

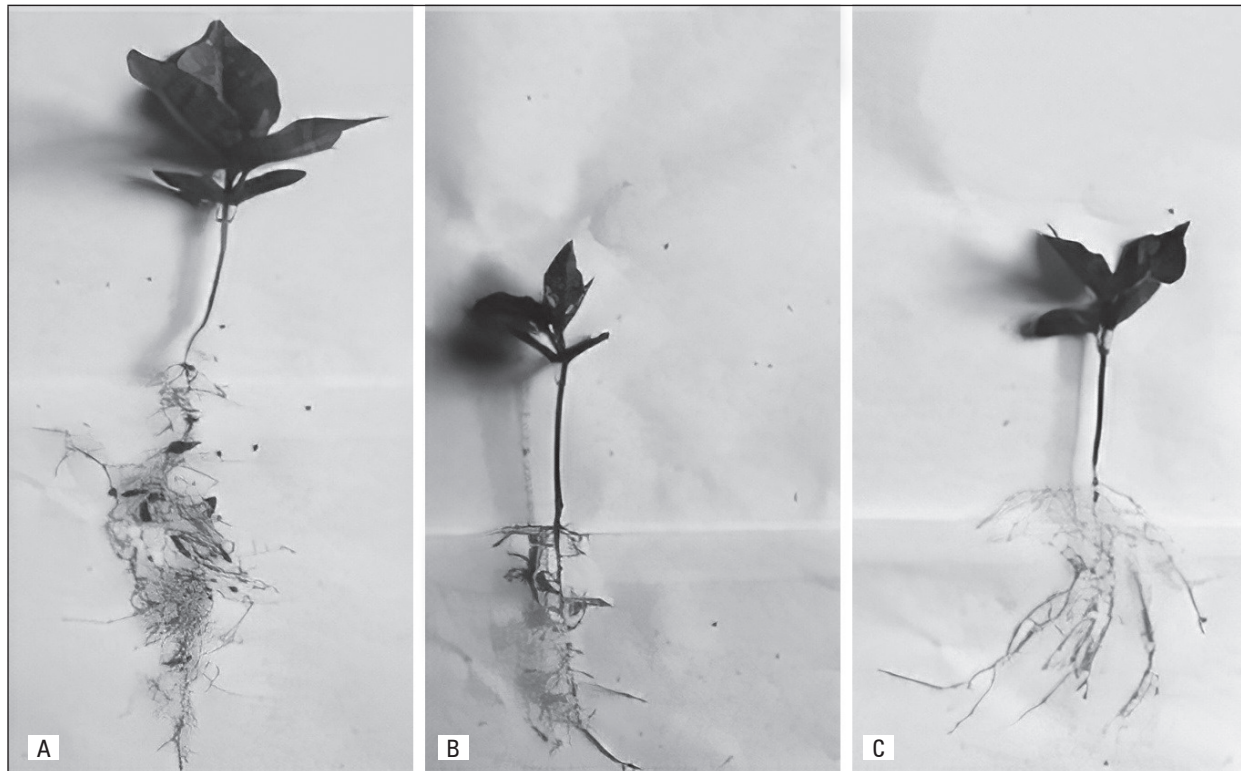
I were less widespread, but with greater thickness, compared to the other treatments. In Soil II, root ramifications were longer and showed a greater thickness than in Bioplant®, but were lower than on the Soil I.



**Figure 1. Adjusted data for root fresh mass of 'FB 200' passion fruit plants in three substrates after sowing.**

Lenhard *et al.* (2013), in studies conducted with the growth of Pau Ferro (*Libidibia ferrea*) seedlings, stated that the reduction of the time in the nursery facilitates the logistics and minimizes production costs, which matches with the experience of Silva *et al.* (2016), in which the use of a commercial substrate in the production of passion fruit seedlings promoted a greater growth of seedlings, favoring not only in reducing the time of plant development, but also in the logistics and the final costs.

FB200 variety, at 60 das, showed a RFM on the three substrates - Soil I, Soil II and Bioplant® - of 0.6259, 0.3741 and 0.9528 g, respectively (Fig. 1). Again, in the Bioplant® substrate a greater root development, as well as a greater accumulation of fresh matter, was observed. Similar results were found by Ferreira *et al.* (2009) who studied the influence of the substrate on the growth of cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)

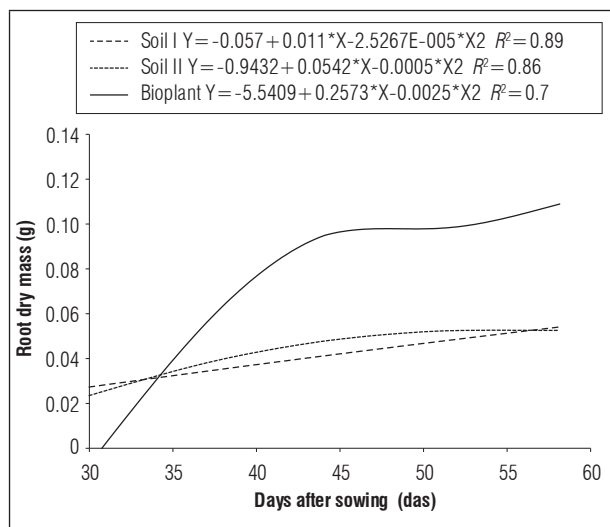


**Figure 2. The root morphology of 'FB 200' passion fruit plants, 30 d after sowing in three types of substrate. A. Soil I; B. Soil II; C. Bioplant®.**



seedlings, using the substrate Bioplant<sup>®</sup>, where a minimal production of aerial part, but a maximum production of roots was observed.

For the variable root dry mass, the substrate Bioplant<sup>®</sup> differ from other substrates, where a quadratic behavior in response to the size of the container used was observed, and where the roots at 50 das restricted their growth (Fig. 3). The values obtained at 35, 40, 45, 50 and 55 das were 0.0156, 0.0419, 0.1019, 0.0707, 0.1355 g for 'FB 200', respectively.



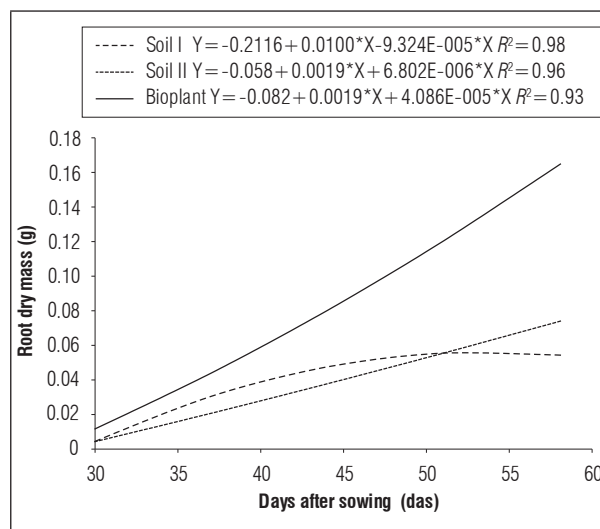
**Figure 3. Adjusted data for root dry mass of 'FB 200' passion fruit plants in three substrates after sowing.**

Comparing the results of Bioplant<sup>®</sup> with the other substrates, they also stood on dry matter accumulation during the evaluation period. However, this ended the root growth when there was exposure of the roots, if adjusting the quadratic model, in response to the variation of time. The values observed at 35, 40, 45, 50 and 55 das were respectively 0.0156, 0.0419, 0.1019, 0.0707, and 0.1355 g for FB 200.

These results are different to those found by Guerra *et al.* (2017) working with the same culture, in which the Bioplant<sup>®</sup> has not resulted in satisfactory conditions of yellow passion fruit seedlings growth. The same dissimilar results to those found in the present study were reported from studies that evaluated the influence of the substrate in the formation of forest seedlings, such as the initial development of seedlings of copaiba (*Copaifera officinalis*) under different levels of shading and substrates (Dutra *et al.*, 2012); of *Eugenia calycina* (Borges *et al.*, 2016) and with the

germination and seed vigor of *Crateavatapia* in different substrates and temperatures (Alves *et al.*, 2012), in all of these the use Bioplant<sup>®</sup> has not provided adequate root development.

According to Zucareli *et al.* (2014), the root system is directly connected to their dry weight, and lower dry weight results in less extensive root system, which implies in a smaller area to be explored in the soil. In yellow passion fruit seedlings, at 35 d, the substrate Bioplant<sup>®</sup> resulted in a root dry weight of 0.0200 g. In addition, at 40 d, the values found were 0.0528 g, followed by 0.1039, 0.1528 and 0.1994 g at 45, 50 and 55 das, respectively, for yellow passion fruit plants in Bioplant<sup>®</sup> (Fig. 4). At 50 das, the second highest RDM was developed in Soil I. Already at 55 d, the Soil I had lower values than the Soil II, which accumulated 0,0753 g of RDM. Miyake *et al.* (2017), working with substrates and nitrogen fertilization on the production of seedlings of yellow passion fruit in protected cultivation conditions, observed that the root dry mass in Bioplant<sup>®</sup> substrate presented the best response (4.0 g RDM) at 120 d after germination, being superior to the other substrates studied, a result similar to that found in the present study (Fig. 4).

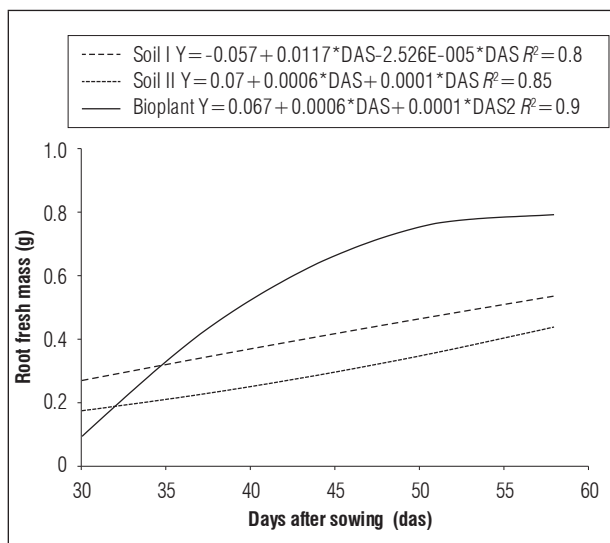


**Figure 4. Adjusted data for root dry mass of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) plants in three substrates after sowing.**

In relation to the root fresh weight of the yellow passion fruit, an exponential behavior was observed for the Soil I and quadratic for the Soil II and for Bioplant<sup>®</sup>. At 30 das, the values found for Soil I, Soil II and Bioplant<sup>®</sup> were 0.2328, 0.2705, and 0,001 g, respectively (Fig. 5).

The substrate Bioplant® has highest concentration of organic matter in its chemical composition and besides, it has adequate levels of calcium and phosphorus, which provides better absorption of water and nutrients by plants, reflecting on the best root

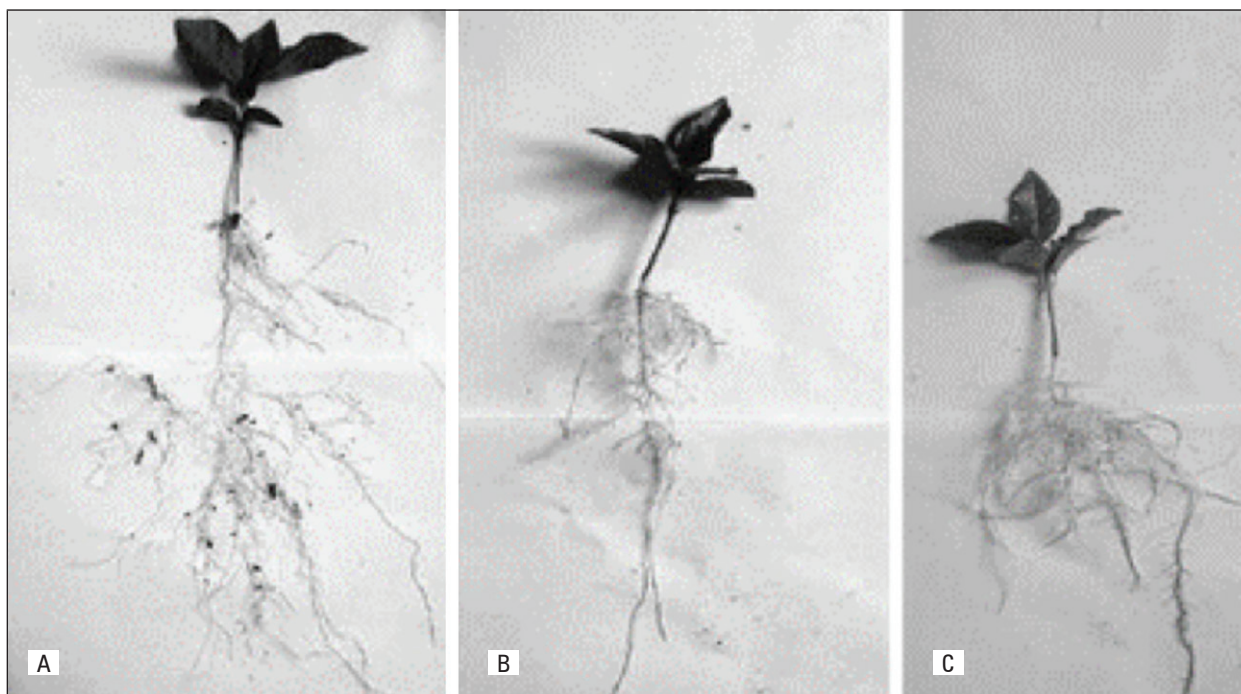
development of plants (Miyake *et al.*, 2017). However, Lima *et al.* (2016) concluded that for the formation of passion fruit seedlings are not indicated substrates with high quantities of Bioplant® or sand, this is contrary to the results of our present study.



**Figure 5.** Adjusted data for root fresh mass of yellow passion fruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) plants in three substrates after sowing.

For the variable root morphology of the yellow passion fruit, as well as in the cultivar FB 200, we noted a difference in the formation of the root system (Fig. 6). The roots, developed in the substrate Bioplant®, proved to be more ramified, presented greater size, but with a lower thickness. Roots from the Soil I were less widespread, but with a greater thickness, in relation to the others, and in this case, were almost similar to the size of those grown in the Bioplant® substrate. In the Soil II, the ramifications were longer and showed to be thicker, more consistent than in the Bioplant®, but lower than in the Soil I.

According to Smiderle and Minami (2001), for the production of seedlings of fruit plants a good substrate must provide adequate water retention which allows a good germination and must maintain sufficient quantities of porous spaces that facilitates the delivery of oxygen, which is indispensable in the process of germination and root development, especially when the substrate is saturated (in excess of water).



**Figure 6.** The root morphology of yellow passion fruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) plants, 30 d after sowing in three types of substrate. A. Soil I; B. Soil II; C. Bioplant®.

## CONCLUSIONS

The substrate promoted the initial development of yellow passion fruit and of cultivar FB 200 plants, with the best seedlings growth in the substrate Bioplant® showing a greater development of fresh and dry matter of roots.

**Conflict of interests:** the manuscript was prepared and reviewed with the participation of the authors, who declare that there exists no conflict of interest that puts in risk the validity of the presented results.

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Almeida, M.O., M.C.M. Cruz, G.D.M. Castro, and M.C.P. Fagundes. 2014. Crescimento e absorção de nutrientes por mudas de maracujazeiro-amarelo em substratos orgânico e comercial e adubação nitrogenada. *Rev. Bras. Ciênc. Agrar.* 9(2), 180-185.
- Alves, E.U., S.S.S. Moura, M.F. Moura, R.S. Guedes, and F.A. Estrela. 2012. Germinação e vigor de sementes de *Cratevatapia L.* em diferentes substratos e temperaturas. *Rev. Bras. Frutic.* 34(4), 1208-1215. Doi: 10.1590/S0100-29452012000400030
- Borges, K., D. Santana, S. Lopes, and V. Pereira. 2016. Coloração do fruto e substrato na emergência e no crescimento de plantas de *Eugenia calycinas* Cambess. *Floresta Ambient.* 23(4), 544-554. Doi: 10.1590/2179-8087.144215
- Cardoso, M.R.D., F.F.N. Marcuzzo, and J.R. Barros. 2014. Classificação climática de Köppen-Geiger para o Estado de Goiás e o Distrito Federal. *Acta Geográfica* 8(16), 40-55. Doi: 10.5654/acta.v8i16.1384
- Dutra, T.R., P.H. Graziotti, R.C. Santana, and M.D. Massad. 2012. Desenvolvimento inicial de mudas de copaíba sob diferentes níveis de sombreamento e substratos. *Rev. Ciênc. Agron.* 43(2), 321-329. Doi: 10.1590/S1806-66902012000200015
- Ferreira, M.G.R., R.B. Rocha, E.P. Gonçalves, E.U. Alves, and G.D. Ribeiro. 2009. Influência do substrato no crescimento de mudas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). *Acta Sci. Agron.* 31(4), 677-681.
- Gomes, F.P. 2000. Curso de estatística experimental. 14<sup>th</sup> ed. ESALQ/USP, Piracicaba-SP, Brazil.
- Guerra, M.S., M.S. Barbosa, E. Costa, G. Haralampidou, and C. Vieira. 2017. Recipiente biodegradável e substratos para mudas de maracujazeiro. *Rev. Agric. Neotrop.* 4(3), 50-54.
- Lenhard, N.R., V.B. de Paiva Neto, S.P.Q. Scalon, and A.A. Alvarenga. 2013. Crescimento de mudas de pau-ferro sob diferentes níveis de sombreamento. *Pesq. Agro. Trop.* 43(2) 178-186. Doi: 10.1590/S1983-40632013000200012
- Leonel, S. and C.J. Pedroso. 2005. Produção de mudas de maracujazeiro doce com o uso de biorregulador. *Rev. Bras. Frutic.* 27(1), 107-109. Doi: 10.1590/S0100-29452005000100029
- Lima, I.M.O., J.S. Silva Júnior, E. Costa, E.D. Cardoso, F.F.S. Binotti, and M.H.A. Jorge. 2016. Diferentes substratos e ambientes protegidos para o crescimento de mudas de maracujazeiro amarelo doce. *Rev. Agric. Neotrop.* 3(4), 39-47.
- Meletti, L.M.M. 2011. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Rev. Bras. Frutic.* 33(1), 83-90. Doi: 10.1590/S0100-29452011000500012
- Miyake, R.T.M., J.E. Creste, N. Narita, and W.E.X. Guerra. 2017. Substrato e adubação nitrogenada na produção de mudas de maracujazeiro amarelo em condições protegidas. *Colloq. Agrar.* 13(1), 57-65. Doi: 10.5747/ca.2017.v13.n1.a149
- Nakagawa, J. 1999. Testes de vigor baseados na avaliação dasplântulas. pp. 49-86. In: Vieira, R.D. and N.M. Carvalho (eds.). Testes de vigor em sementes. FUNEP, Jaboticabal-SP, Brazil.
- Negreiros, J., V.S. Álvares, L.R. Braga, and C.H. Bruckner. 2004. Diferentes substratos na formação de mudas de maracujazeiro-amarelo. *Ver. Ceres,* 51(294), 243-249.
- Roncatto, G., G.C. Nogueira Filho, C. Ruggiero, J.C. Oliveira, and A.B.G. Martins. 2008. Enraizamento de estacas herbáceas de diferentes espécies de maracujazeiro. *Rev. Bras. Frutic.* 30(4), 1094-1099. Doi: 10.1590/S0100-29452008000400041
- Silva, W.L., A.S. Brito, C.F.B. Brito, N.L.S. Mesquita, and Y.C.P. Silva. 2016. Desenvolvimento de maracujazeiro em recipientes e substratos a base de resíduo de vermiculita. *Agrotec.* 7(1), 53-60. Doi: 10.12971/2179-5959/agrotecnologia.v7n2p53-60
- Smiderle, O.S. and K. Minami. 2001. Emergência e vigor de plântulas de goiabeira em diferentes substratos. *Rev. Ciênc. Rur.* 6(1), 38-45.
- Statistical Analysis System. 2002. SAS Institute, Cary, NC.
- Zaccheo, P.V.C., R.S. Aguiar, N.M.C. Stenzel, and C.S.V.J. Nevez. 2013. Tamanho de recipientes e tempo de formação de mudas no desenvolvimento e produção de maracujazeiro-amarelo. *Rev. Bras. Frutic.* 35(2), 603-607. Doi: 10.1590/S0100-29452013000200032
- Zucareli, V., O.E. Orika, C.S.F. Boaro, and W.P. Brambilla. 2014. Desenvolvimento inicial de maracujazeiros (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, *P. edulis* f. *edulis* e *P. alata*) enxertados sobre *Passiflora cincinnata*. *Ciênc. Agrar.* 35(5), 2325-2340.

## POLÍTICA EDITORIAL

La *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* es el órgano oficial científico de la Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas (SCCH) (adscrita a la International Society for Horticultural Science, ISHS), de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC) y de la Facultad de Ciencias Agrarias y del Medio Ambiente de la Universidad Francisco de Paula Santander (UFPS), con frecuencia cuatrimestral en el territorio nacional. Constituye una publicación abierta a la discusión y difusión de trabajos técnico-científicos en el área de las ciencias agrícolas, con énfasis en horticultura (frutales, hortalizas, ornamentales, hierbas aromáticas y medicinales, viveros) y disciplinas afines, propuestos por autores nacionales e internacionales. Busca divulgar trabajos inéditos desarrollados por investigadores de diversas universidades y centros de investigación del país, y difundir y someter a discusión los avances científicos que se producen, con el fin de contribuir a la consolidación de una comunidad académica congregada en torno a las disciplinas afines a la horticultura. La revista está dirigida a investigadores de las ciencias hortícolas, extensionistas y a todos aquellos profesionales afines que desarrollan la ciencia y aplican la tecnología para beneficio de la productividad del campo y de los productores hortícolas.

Los artículos originales e inéditos deben presentarse según las normas establecidas en las instrucciones para los autores. El Comité Editorial se reserva el derecho de aceptar o no las contribuciones que se hagan a la revista. Los manuscritos se enviarán a dos pares evaluadores expertos en el área específica del conocimiento, quienes decidirán si el artículo tiene el nivel científico necesario para publicarse. Si se llega a presentar alguna diferencia de conceptos en cuanto a la aprobación para publicación, el artículo será enviado a un tercer par, quien entregará la decisión final. Si el artículo se acepta para publicación, el autor debe realizar las correcciones sugeridas en el tiempo indicado por el editor.

Los artículos publicados en la revista serán enviados en medio magnético a las diferentes bases de datos y sistemas de indexación, para la divulgación de su contenido y se podrán consultar a través de internet. Después de la publicación, se enviará un archivo en pdf, sin costo adicional, al autor correspondiente.

Los editores de la *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* están comprometidos con la comunidad científica en garantizar la ética y calidad de los artículos publicados. La revista tiene como referencia el código de conducta y buenas prácticas editoriales para editores de revistas científicas que define el Comité de Ética de Publicaciones (COPE, Committee on Publication Ethics). Al mismo tiempo, garantiza una adecuada respuesta a las necesidades de los lectores y autores, asegurando la calidad de lo publicado, protegiendo y respetando el contenido de los artículos así como la integridad de los mismos. El Comité Editorial publicará las correcciones, aclaraciones, retracciones y disculpas cuando sea necesario.

El *copyright* de los artículos e ilustraciones publicados en la *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* llegan a ser propiedad de la revista. Los editores autorizan la reproducción y citación del contenido de la publicación, siempre y cuando se registre de forma explícita el nombre de la revista, nombre(s) del (de los) autor(es), año, título del artículo, volumen, número y página del artículo consultado. Se requiere el permiso de los editores para reproducir más que un resumen corto del texto o de reproducir figuras en otras publicaciones. Instrucciones para los autores.



## INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

Los autores de los artículos a someter a la *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* tienen que ser conscientes y evitar la mala conducta científica relacionada con: fraude científico en la totalidad o parte de los datos del estudio y la falsificación y manipulación de datos; falta de ética por autoría ficticia o regalada e intercambio de coautorías, la publicación duplicada de una parte del artículo como de su totalidad y el autoplagio con la repetición de texto ya publicados de su propia autoría. Además, la omisión de citas, copia de citas sin consulta y el exceso de autocitas, entre otros. Los autores tienen los siguientes derechos: la evaluación de los artículos será justa e imparcial y la revisión se hará en un tiempo razonable, habrá respeto en la correspondencia enviada y las solicitudes de cambios y correcciones serán explícitas según los conceptos de los evaluadores; se mantendrá la inalterabilidad en el original.

Los artículos puestos a consideración del Comité Editorial de la *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* deben ser inéditos; en consecuencia, aquellos manuscritos que hayan sido publicados en otras revistas o publicaciones técnico-científicas no serán aceptados. Para ello se utilizará *software* especializado en la identificación.

La *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* acepta artículos originales de los siguientes tipos, en concordancia con lo requerido por el programa Publindex de Colciencias:

- *Artículo de investigación científica y tecnológica*: documento que presenta de manera detallada los resultados originales de proyectos de investigación. La estructura generalmente utilizada tiene cuatro partes esenciales: introducción, metodología (materiales y métodos), resultados y discusión, y conclusiones. Como mínimo un 18% de la extensión total del artículo debe corresponder a la literatura citada. Y un 60% de las citas debe provenir de artículos publicados en los últimos 10 años.
- *Artículo de reflexión*: documento que presenta resultados de investigación desde una perspectiva analítica, interpretativa y crítica del autor, sobre un tema específico y recurriendo a fuentes originales. Es indispensable que tenga una introducción de contexto con un objetivo claro sobre el artículo y un desarrollo temático que presente a los lectores una visión de conjunto y actualizada del tema, además de una propuesta o hipótesis cuyo desarrollo discursivo se nutra de referencias bibliográficas reconocidas (no son admisibles artículos sin referencias). Es importante que estas piezas tengan subtítulos sugerentes y pertinentes.
- *Artículo de revisión*: documento sobre un tema de actualidad, escrito, por lo general, para un público bien informado. Es resultado de una investigación en la que se analizan, sistematizan e integran los resultados de investigaciones, publicados o no, sobre un campo en ciencia o tecnología, con el fin de dar cuenta de los avances y tendencia de desarrollo; se caracteriza por presentar un soporte bibliográfico cuidadoso no menor a 50 referencias.
- *Nota científica*: documento breve que presenta resultados originales preliminares o parciales de una investigación científica o tecnológica, que por lo general requieren de una pronta difusión.

### Formato y organización del texto

La extensión del artículo de investigación no debe exceder las 5.200 palabras (incluidas referencias y tablas), excepto el artículo de revisión, que puede contener hasta 6.500 palabras; tamaño carta, escritas a doble espaciado, letra o fuente Times New Roman con tamaño de 12 puntos, márgenes de 3 cm en la parte superior, 2 cm en la inferior y 2,5 cm en las márgenes derecha e izquierda. Las tablas y figuras (gráficos, dibujos, esquemas, diagramas de flujo, fotos y mapas) deben presentarse cuando sean citadas en el texto y con numeración consecutiva (Tabla 1 ... Tabla n. Figura 1 ... Figura n; etc.). Los textos y tablas deben presentarse en el procesador de palabra MS-Word®; las gráficas y los diagramas de frecuencia (barras y tortas) originales deben suministrarse en archivos editables como MS-Excel®; otras figuras, como fotografías sobre papel y dibujos, se pueden enviar en formato digital TIF (o JPEG), preferiblemente con una resolución de 600 × 600 dpi (mínimo 300 dpi). Como norma general, las tablas y figuras solo se aceptan en blanco y negro. El artículo en su versión



.doc o .docx debe ser enviado a través del Portal de Revistas UPTC, [https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias\\_hortícolas](https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_hortícolas), junto con los demás anexos y una imagen representativa del manuscrito como portada (preferiblemente inédita).

### Idiomas, unidades y estilo

A partir de 2019 el idioma oficial de la revista es el inglés. Se puede usar el estilo británico o americano pero manteniendo el mismo durante todo el artículo. Debe utilizarse exclusivamente el Sistema Métrico Decimal (SI). Todas las abreviaturas diferentes al SI se deben explicar cuando se usan por primera vez en el texto. El estilo del texto debe ser impersonal y tiempo gramatical pasado para la introducción, procedimientos y resultados.

### Título y autores

Es obligatorio la traducción del título al español. Cuando se incluyan nombres científicos de vegetales o animales, se deben escribir con letra cursiva (itálica) y en minúsculas, y solo con mayúsculas la primera letra del género y el clasificador. Debajo del título en español se escribe el (los) nombre(s) y apellido(s) del (de los) autor(es), de acuerdo con su contribución en la investigación o preparación del artículo. En la parte inferior de la primera página, es decir, en aquella que contiene el título del artículo, se debe señalar el nombre y la ciudad de ubicación de la entidad a la cual prestan sus servicios o del patrocinador para la realización del trabajo y el autor para correspondencia con su correo electrónico. Además el identificador ORCID para cada autor.

### Resumen y palabras clave adicionales

El resumen debe describir en forma breve el problema, los métodos utilizados, su justificación y los resultados obtenidos más relevantes, y no debe exceder de 250 palabras escritas en un único párrafo. Es obligatorio acompañar el resumen con máximo seis palabras clave, que no hayan sido usadas en el título. El *abstract* y *additional keywords* deben traducirse al español (resumen y palabras clave adicionales).

### Introducción

Sección que debe contener la situación actual del problema, su definición y la revisión de los trabajos previos relacionados con él; además, los objetivos y la justificación de la investigación. Es obligatorio acompañar los nombres vulgares con el (los) nombre(s) científico(s) y la(s) abreviatura(s) del clasificador en la primera mención en el artículo.

### Materiales y métodos

En este apartado se deben describir de forma clara, concisa y secuencial, los materiales (vegetales, animales, implementos agrícolas o de laboratorio) utilizados en desarrollo del trabajo, además de los procedimientos o protocolos seguidos y el diseño escogido para el tratamiento estadístico de los datos.

### Resultados y discusión

Los resultados deben presentarse de manera lógica, objetiva y secuencial mediante textos, tablas y figuras; estos dos últimos apoyos deben ser fáciles de leer y deben poderse interpretar de manera autónoma, aunque deben citarse siempre en el texto. Las gráficas serán bidimensionales y a una sola tinta, con porcentajes de negro para las variaciones de las columnas; las líneas de las curvas deben ser de color negro, punteadas o continuas (- - - o —), usando convenciones como: ■, □, ◆, ▲, ●, etc.

Las tablas se deben elaborar con pocas columnas y filas. Los promedios deben ser acompañados de su error estándar correspondiente. La discusión de resultados debe ser completa y exhaustiva, contrastando los resultados obtenidos con la literatura más actual sobre el tema.

### Conclusiones

En este apartado se relacionan los hallazgos más concluyentes de la investigación, es decir, aquellos que constituyen un aporte significativo para el avance del campo temático explorado.

## Agradecimientos

Si se considera necesario, se agradecerán aquellas contribuciones importantes en la concepción, financiación o realización de la investigación: especialistas, firmas comerciales, entidades oficiales o privadas, asociaciones de profesionales y operarios. En el momento de incluir el financiador, mencionar el nombre del proyecto o contrato y su código de identificación interna.

## Conflictos de interés y contribuciones de autoría

Mencionar los posibles conflictos de interés (relaciones personales o contractuales) que pueden contribuir en la interpretación de los resultados. En lo posible, mencionar las contribuciones individuales de los autores en la elaboración de la investigación y escritura del manuscrito.

## Referencias bibliográficas

Para las citas bibliográficas que sustentan las afirmaciones en el texto, se utilizará el sistema *autor(es)*, año de manera uniforme; cuando la publicación citada tenga tres o más autores, se debe mencionar el apellido del primer autor acompañado de la expresión latina *et al.*, equivalente a “y otros”, en cursivas y con el año (por ejemplo: García *et al.*, 2003). En el momento de usar citas textuales de otros autores, usar comillas dobles y mencionar la página de ubicación. Se recomienda parafrasear con varios autores y evitar las inclusiones literales. La lista completa con las referencias bibliográficas mencionadas se debe incluir al final del artículo. Los apellidos y nombres de todos los autores deben escribirse, en el orden alfabético de sus apellidos; cuando se citan varias publicaciones del (de los) mismo(s) autor(es) deben listarse en orden cronológico, de la más reciente a la más antigua. Es obligatorio incluir al final de cada cita el DOI (*digital object identifier*) y el manuscrito debe contener como mínimo un 30% de sus citas con este identificador. Solo se deben citar fuentes originales. Se prevén algunos casos:

- **Para libros:** Autor (es), año. Título del libro, edición, casa editora, ciudad y país. Ejemplo: Taiz, L. y E. Zeiger. 2006. *Plant physiology*. 4th ed. Sinauer Associates Publishers, Sunderland, MA, USA.
- **Para capítulos de libros:** Autor (es), año. Título del capítulo, páginas consultadas (pp. # - #). En: Apellidos y nombres de los compiladores (comp.) o editores (eds.), título del libro, edición, casa editora y ciudad de su sede. Ejemplo: Engels, C., E. Kirkby y P. White. 2012. Mineral nutrition, yield and source-sink relationships. pp. 85-133. En: Marschner, P. (ed.). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. Doi: 10.1016/B978-0-12-384905-2.00005-4
- **Para revistas:** Autor (es), año. Título del artículo, nombre abreviado de la revista volumen(número), página- página. Ejemplo: García, S., W. Clinton, L. Arreaza y R. Thibaud. 2004. Inhibitory effect of flowering and early fruit growth on leaf photosynthesis in mango. *Tree Physiol.* 24(3), 387-399. Doi: 10.1093/ treephys/24.4.387
- **Para revistas electrónicas:** Autor(es), año. Título del artículo (en línea). Nombre abreviado o corto de la revista. Volumen (número), URL; fecha de consulta. Ejemplo: Cannarella, C. y V. Piccioni. 2007. Innovation, diffusion and territorial inertia (en línea). *Int. J. Rural Manag.* 3, <http://irm.sagepub.com/content/vol3/issue2/in01.pdf>; consulta: marzo de 2009.
- **Para citas de internet:** Autor (es), año. Título del artículo. En: Nombre de la publicación electrónica del sitio web, portal o página y su URL, fecha de consulta. Ejemplo: Arafat, Y. 1996. Siembra de olivos en el desierto palestino. En: *Agricultura Tropical*, <http://agrotropical.edunet.es>; consulta: noviembre de 2003.
- **Para citas de ponencias en memorias de conferencias, simposios o congresos:** Autor(es). Año. Nombre de la ponencia. pp. #-#. En: Título. Casa editora. Ciudad, país si la ciudad no es capital. Ejemplo: Peet, M. 2008. Desórdenes fisiológicos del fruto del tomate. p. 101. En: Libro de resúmenes, Simposio Internacional de Tomate en el Trópico. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas. Villa de Leyva, Colombia.
- **Para tesis:** Autor(es). Año. Título. Tesis de doctorado (o maestría). Institución educativa, ciudad y país. Ejemplo: Hernández, M. 2001. Conservación del fruto de arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh)

durante la poscosecha mediante de aplicación de diferentes técnicas. Tesis de doctorado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

### Sistema Internacional de Unidades (SI) o Sistema Métrico Decimal

La *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* exige el uso de las unidades propias del SI.

- Los números superíndice negativos pueden ser usados *solamente* con unidades del SI (por ejemplo, kg ha<sup>-1</sup>). No interrumpa la notación de unidades del SI con símbolos que no corresponden a unidades SI ni con palabras diferentes, porque las unidades son expresiones matemáticas. Reordene la frase apropiadamente, por ejemplo:
  - P a 20 g L<sup>-1</sup>, y no 20 g P L<sup>-1</sup> ni 20 g P/L.
  - El rendimiento en peso seco fue de 5 g día<sup>-1</sup>, y no 5 g de peso seco día<sup>-1</sup>.
  - Se aplicaron 25 g ha<sup>-1</sup> del ingrediente activo, y no 25 g i.a./ha.
  - Cada planta recibió 20 g ha<sup>-1</sup> de agua, y no 20 g H<sub>2</sub>O/ha por planta.
- La barra (/) es un signo que en matemáticas significa “dividido por”; en ciencias se usa como: sustituto de la preposición “por” en el sentido de “por cada” y se utiliza para mostrar ratas o tasas. Use la barra para conectar unidades del SI con unidades que no son del SI (por ejemplo: 10°C/h o 10 L/matera). Nunca use los números superíndice negativos y la *barra* en la misma expresión. Si se hallan mezcladas unidades del SI con unidades que no son del SI, use primero la *barra* y luego la palabra “por” en segundo término. Nunca utilice dos o más *barras* (/) o la palabra “por” más de una vez en la misma frase, pues estos dos términos son equivalentes; por ejemplo en cepilladas/día por planta, redacte la frase así: cada planta fue cepillada dos veces al día. Para unidades totalmente verbales, use una barra, como en tres flores/planta o 10 frutos/rama.
- Para citar aquellas unidades que se basan en nombres, use minúsculas como en: “un siemens representa...”. Sin embargo, los grados Celsius (°C) y grados Brix (°Brix) sí van en mayúsculas.
- Use la misma abreviatura o símbolo para las formas en singular o plural de una unidad determinada (por ejemplo, 1 kg y 25 kg). Deje un espacio entre el valor numérico y el símbolo (por ejemplo, 35 g y no 35g). En una serie de medidas ponga la unidad al final así: entre 14 y 20°C o hileras a 3, 6 y 9 m.

El estilo admitido en *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* para algunas unidades de medida se indica en la tabla de abreviaturas y símbolos (ver ASHS Publications Style Manual, [http://www.ashs.org/downloads/style\\_manual.pdf](http://www.ashs.org/downloads/style_manual.pdf); consulta: junio de 2011 o *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 4(1), 2010, pp. 181-184).

## EDITORIAL POLICY

The *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* (Colombian Journal of Horticultural Science) is the official scientific journal of the Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas (SCCH) (Colombian Society for Horticultural Science; country member of ISHS), the Faculty of Agricultural Sciences of the Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), and the Faculty of Agricultural Sciences and the Environment of the open to discussion and dissemination of technical and scientific studies in the area of agricultural sciences, with an emphasis on horticulture (fruits, vegetables, ornamentals, aromatic and medicinal plants, nurseries) and related disciplines proposed by national and international authors. The journal seeks to disclose

unpublished work developed by researchers from different universities and research centers in the country; and disseminate and discuss scientific advances, in order to contribute to the consolidation of an academic community centered on the disciplines related to horticulture. The journal is geared toward horticultural science researchers, extension workers, and all professions related to the development of science and technology needed for the benefit of rural productivity and horticultural producers.

Original and unedited papers must be submitted according to the rules laid out in the instructions to authors. The Editorial Committee reserves the right to accept or reject contributions to the journal. The manuscripts will be sent to two peer reviewers, who are experts in the specific area of knowledge, and they will decide whether the manuscript has the necessary scientific standards for publication. If there is a difference of opinion regarding the concepts for the approval for publication, the manuscript will be sent to a third reviewer, who will deliver the final decision. If the article is accepted for publication, the author must make the suggested corrections within the time indicated by the editor.

The articles published in the journal will be sent on magnetic media to different databases and indexing systems for disclosure of its content; and will be accessible via the Internet. After publication, a pdf file of the paper will be sent, free-of-charge, to the corresponding author.

The editors of the *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* are committed to the scientific community in ensuring the ethics and quality of published articles. The journal has as a reference, the code of conduct and good publishing practices for editors of scientific journals, defined by the Committee on Publication Ethics (COPE); and furthermore, is dedicated to ensuring an adequate response to the needs of readers and authors, ensuring the quality of the publication, protecting and respecting the content of the articles and the integrity thereof. The Editorial Committee will publish corrections, clarifications, retractions and apologies when needed.

The copyright of all articles and illustrations published in *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* becomes the property of the Revista. The editors authorize reproduction and citation of the published content, provided the name of the journal, name(s) of the author(s), year, title, volume, number and page of the article are explicitly given. Editorial permission is required to reproduce more than a brief summary of the text, or to reproduce figures etc., in further publication(s).

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

The authors of the articles submitted to the journal *Agronomía Colombiana* must be aware of and avoid scientific misconduct related to: scientific fraud in all or part of the data of the study and data falsification and manipulation; dishonesty due to fictitious authorship or gifting or exchange of co-authorship, duplicate publications, partial or complete, in different journals and self-plagiarism by reusing portions of previous writings; citation omission, citation copying without consultation and excessive self-citation, among others. The authors have the following rights: fair and impartial evaluation of articles done in a reasonable amount of time, correspondence shall be taken seriously and requests for changes and corrections shall be respected, subject to review by the evaluators, and articles shall remain unaltered.

The contents of articles/manuscripts submitted to the *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* must not have been previously published in a refereed publication and submission to the *Revista* implies no concurrent submissions to other journals. Manuscripts already published in other journals or technical or extension reports will not be accepted. The *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* publishes articles of the following types, according to the program: Publindex, Colciencias (Colombia):

- **Scientific and technological research papers:** those documents presenting detailed original research results. The most generally applied structure has four main parts: introduction, materials and methods, results and discussion, and conclusions. At a minimum, 18% of the total text should correspond to the cited references, 60% of which must have been published in the last 10 years.
- **Review articles:** documents written for a general, albeit well-informed audience. The review article should analyze, systematize, or summarize the published or non-published results of an area of science or technology for the purpose of providing information on the current state and perspectives of development of a particular research. The review article should be supported by not less than 50 references.
- **Reflection paper:** document presenting research results analyzed from an author's interpretative and critical perspective about a specific subject, resorting to original sources. This type of article must always have a clear contextual introduction coupled to a pertinent objective within the topic. The development of said objective should include a broad and updated perspective on the topic and a hypothetical statement or proposal backed up by recognizable references (no article will be accepted without references). The reflection article should include suggestive and pertinent subtitles.
- **Scientific note:** brief document introducing original preliminary or partial results of a scientific or technical research, which usually need immediate publication.

### Format and organization of text

Research papers should not exceed 5,200 words (including literature and tables), except for review articles, which can contain up to 6,500 words: in letter size, double-spaced, Times New Roman font size 12, margins of 3 cm at the top, 2cm at the bottom and 2.5 cm in the left and right side margins. Tables and figures (graphs, drawings, diagrams, flow charts, pictures and maps) must be submitted on separate pages and numbered consecutively (Table 1 ... Table n. Figure 1..., etc.) in the order cited in the text.

Texts and tables should be prepared using an MS-Word® processor. Tables and diagrams of frequency (bar and circular diagrams) should be included in the mentioned Word file, as well as in their original MS-Excel® or other format. Other figures, including photographs and drawings, should be submitted in digital JPG (or JPEG) compression format, with a minimum resolution of 300 dpi. As a general rule, tables and figures should only be submitted in black and white, or when the costs of color publication are covered by the authors. Articles with the relevant files in Word, Excel and JPG should be sent by email to: [gerfischer@gmail.com](mailto:gerfischer@gmail.com) (editor Gerhard Fischer).

### Languages, units, and style

The official languages of the Journal are Spanish, English and Portuguese. In the case of English manuscripts, British or American English spelling and terminology may be used, but either should be consistently used throughout the article. The metric system (SI) should be consistently utilized throughout the manuscript. All abbreviations should be explained when they first appear in the manuscript. The style of writing should be impersonal, in the past tense for the introduction, procedures and results.

### Title and authors

The title should be accompanied by the English translation if the article's text is in Spanish or Portuguese and vice-versa. The scientific name of plants and animals should be italicized and written in Latin with the generic name starting with a capitalized letter and including the descriptor's name. Under the titles, the authors' names (first and last names) should be listed in the order in which they contributed to the investigation and preparation of the manuscript. On the bottom of the first page (footnote) of the article, the current



affiliations and addresses (including city, state, and institutions) of each author and the corresponding author with his/her e-mail should appear.

### **Abstract, “resumen”, and additional keywords**

The abstract should briefly describe the problem, the methods used, the justification and the relevant results obtained; and should not exceed 250 words written in a single paragraph. The “resumen” should be written in Spanish (or Portuguese) and the “abstract” should include an English translation. It’s obligatory to accompany the abstract with a maximum of six keywords, which have not been used in the title. Equally, when translated into English, the additional keywords may not appear in the English-version of the title.

### **Introduction**

The text should contain the current situation of the problem, its definition and review of the studied area, the objectives and justification for the research. Common names of plants and animals must be accompanied with the corresponding scientific ones, plus the abbreviation of the species author surname when mentioned for the first time.

### **Materials and methods**

Besides a clear, precise and sequential description of the materials used for the research (plant or animal materials, agricultural or laboratory tools), this section illustrates the procedures and protocols followed, and the experimental design chosen for the statistical analysis of the data.

### **Results and discussion**

The results shall be presented in a logical, objective, and sequential order, using text, tables and figures. The latter two should be easily understandable and self-explanatory, regardless of a thorough explanation in the text. The graphics should be two-dimensional and prepared in black and white, using varying tones to illustrate variations between columns. Diagram curves must be prepared in black, dashed or continuous lines (- - - or \_\_\_\_\_), using the following conventions: ■, □, ◆, Δ, etc. The tables should contain few columns and lines.

Averages should be accompanied by their corresponding standard error (SE) values. The discussion shall be complete and exhaustive, emphasizing the highlights and comparing them to the literature.

### **Conclusions**

This section should summarize in a brief and concise form the most important findings of the research, such as those containing the most significant support in the studied area.

### **Acknowledgements**

When considered necessary, the authors may acknowledge the researchers or entities that contributed - conceptually, financially or practically - to the research: specialists, commercial organizations, governmental or private entities, and associations of professionals or technicians.

### **Bibliographic references**

For short citations located in the text, use the system: author(s), year uniformly. When the publication cited has three or more authors, please mention the name of the first author accompanied by the Latin phrase *et al.*, with the year (e.g. Garcia *et al.*, 2012). The complete list of the references listed must be included at end of article. The initials of the first names and the surnames of all authors must be written in alphabetical order for the last names; when several publications are cited, the author(s) should be listed in chronological order, from most recent to oldest. Each citation must contain a DOI (digital object identifier) at the end. Furthermore, the text of the manuscript must contain a minimum of 30% of the citations found in the Bibliographic References section with their respective DOI. Examples of literature citations are given below:

- **For books:** Author(s), year. Title of the book, edition, publisher and the place of publication, pages consulted (pp. # - #). Example: Taiz, L. and E. Zeiger. 2006. *Plant physiology*. 4<sup>th</sup> ed. Sinauer Associates Publishers, Sunderland, MA, USA.
- **For book chapters:** Author(s), year. Title of the chapter, pages consulted (pp. # - #). In: Last name(s) and initial(s) of first name(s) of contributors or authors (eds.), title of the book, publisher and the place of publication. Example: Engels, C., E. Kirkby, and P. White. 2012. Mineral nutrition, yield and source-sink relationships. pp. 85-133. In: Marschner, P. (ed.). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. Doi: 10.1016/B978-0-12-384905-2.00005-4
- **For journal articles:** Author(s), year. Title of the article, journal number, volume, pages. Example: García, S., W. Clinton, L. Kukshin, and R. García. 2004. Inhibitory effect of flowering and early fruit growth on leaf photosynthesis in mango. *Tree Physiol.* 24(3), 387-399. Doi: 10.1093/treephys/24.4.387
- **Electronic journals:** Author(s). Year. Title of the publication (online). Abbreviated name of the journal. Volume (number), URL; consultation date. Example: Cannarella, C. and V. Piccioni. 2007. Innovation, diffusion and territorial inertia (online). *Int. J. Rural Manag.* 3, <http://irm.sagepub.com/content/vol3/issue2/in01.pdf>; consulted: March, 2009.
- **Internet citations:** Author(s). Year. Title of the article. In: name(s) of the electronic publication, and/or of the website, portal or page, URL; consultation date. Example: Arafat, Y. 1996. Siembra de olivos en el desierto palestino. In: *Agricultura Tropical*, <http://agrotropical.edunet.es>; consulted: November, 2003.
- **For citing proceedings:** Author(s). Year. Name of the dissertation. pp. #-#. Title. Publisher, City (and country, if the city is not a capital). Example: Peet, M. 2008. Physiological disorders in tomato fruit development. p. 101. In: Book of abstracts, International Symposium on Tomato in the Tropics. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas. Villa de Leyva, Colombia.
- **For theses:** Author(s). Year. Title. Thesis degree. Academic institution, city (and country, if the city is not a capital). Example: Hernandez, M. 2001. Conservación del fruto de arazá (*Eugenia stipitata*McVaugh) durante la poscosecha mediante de aplicación de diferentes técnicas. Doctoral thesis. Faculty of Agronomy, Universidad Nacional de Colombia, Bogota, Colombia.

## International unit system (SI) or metric unit system

The *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* requires the use of SI units (Système international d'unités).

The numbers of multiplication and the negative numbers of the superscripts should be used only in conjunction with SI units (for example, kg ha<sup>-1</sup>). Do not place non-SI units in SI units, because the units are mathematical expressions. Reorganize the phrase respectively, for example:

P at 20 g L<sup>-1</sup>, but not 20 g P L<sup>-1</sup>, nor 20 g P/L.

The yield measured in dry mass was 10 g d<sup>-1</sup>, but not 10 g of dry mass d<sup>-1</sup>.

The active ingredient was applied at 25 g ha<sup>-1</sup>, but not 25 g a.i./ha.

Each plant received water at 30 g ha<sup>-1</sup>, but not irrigation was applied at 30 g H<sub>2</sub>O/ha per plant.

The slant line (/) is a symbol of mathematic operation that means "division"; in science, it may be substituted by the word "per" in the meaning of "per each" and indicates rates or degrees. Use the slant line to connect SI units with non-SI units (for example: 10°C/h or 10 L/plant). Never use the raised period and slant line in the same expression. If you mix SI and non-SI units, use the slant line first and then the word "per" in the second terminus. Never use two or more slashes (/) or the word "per" more than once

in the same phrase to avoid redundancy, for example: irrigation/day per plant should be changed to: each plant was irrigated two times per day. For the totally verbal units, use one slash, such as: three flowers/plant or 10 fruits/branch.

To cite units based on names, use lowercase, such as: “one siemens represents...”. However, Celsius units should be written with the first letter capitalized.

Use the same abbreviation or symbol for the singular and plural forms of a unit (for example, 1 kg and 25 kg). Leave a blank space between the numerical value and the symbol (for example, 35 g, but not 35g), except for a percentage or °C, such as: between 14 and 20°C or growth up to 3, 6, and 9 m.

The style adopted by the *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* for some units of measurements refers to the table of abbreviations and symbols of ASHS Publications Style Manual, [http://www.ashs.org/downloads/style\\_manual.pdf](http://www.ashs.org/downloads/style_manual.pdf), accessed June 2011 or can be consulted in *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 4(1), 2010, pp. 181-184.

## POLÍTICA EDITORIAL

A *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* é o órgão científico oficial da *Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas – SCCH* (adscrita à *International Society for Horticultural Science – ISHS*), da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC) e da Faculdade de Ciências Agrárias e Meio Ambiente da Universidad Francisco de Paula Santander (UFPS). Trata-se de uma publicação trimestral aberta a discussão e divulgação de trabalhos técnico-científicos propostos por autores nacionais e internacionais na área das ciências agrícolas, com ênfase em horticultura (frutas, legumes, ervas medicinais, plantas ornamentais e viveiro) e disciplinas afins. A revista busca não só divulgar o trabalho inédito desenvolvido por pesquisadores de diferentes universidades e centros de investigação no país, mas também disseminar e discutir novos avanços científicos, a fim de contribuir para a consolidação de uma comunidade acadêmica reunida em torno da horticultura e suas disciplinas relacionadas. A publicação está dirigida a pesquisadores e extensionistas das ciências hortícolas e a todos aqueles profissionais que desenvolvem a ciência e aplicam a tecnologia para o benefício da produtividade do campo e os produtores hortícolas.

Artigos inéditos e originais devem ser apresentados seguindo as regras estabelecidas nas instruções aos autores. O Conselho Editorial reserva-se o direito de aceitar ou rejeitar as contribuições feitas para a revista. Os manuscritos são enviados a dois revisores especialistas na área específica do conhecimento, quem decidirão se o trabalho tem o nível científico necessário para sua publicação. Caso haja diferentes conceitos sobre a aprovação da publicação, o artigo será enviado a um terceiro par, quem entregará a decisão final. Se o artigo for aceito para publicação, o autor deverá fazer as correções sugeridas no tempo indicado pelo editor.

Os artigos publicados na revista serão enviados em meio magnético a diferentes bancos de dados e sistemas de indexação para a divulgação do seu conteúdo, o qual será acessível através da Internet. Após a publicação, os artigos publicados serão enviados aos autores num arquivo em PDF sem custo adicional.

Os editores da *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* estão comprometidos com a comunidade científica para assegurar a ética e a qualidade dos artigos publicados. A revista tem como referência o código de conduta e boas práticas editoriais definido pelo Comitê de Ética de Publicações (*Committee on Publication Ethics - COPE*). Ao mesmo tempo, os editores asseguram uma resposta adequada às necessidades dos leitores e autores, para o qual devem garantir a qualidade das publicações e proteger e respeitar o conteúdo dos artigos e a integridade dos mesmos. O Conselho Editorial publicará correções, esclarecimentos, retratações e desculpas quando for necessário.

O *copyright* dos artigos e ilustrações publicados na *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* vem a ser propriedade da revista. Os editores autorizam a reprodução e citação do conteúdo da publicação desde que seja explicitamente registrado o nome da revista, nome(s) do(s) autor(es), ano, título, volume, número e páginas do artigo consultado. É preciso solicitar permissão dos editores para ter figuras ou algo mais que um breve resumo do texto reproduzidos em outras publicações.

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os autores dos artigos a serem submetidos à *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* devem ser conscientes da fraude científica e evitar condutas relacionadas com ela em todos ou parte dos dados da pesquisa, assim como a falsificação e manipulação dos mesmos, as faltas de ética por autoria fictícia ou doada ou por troca de co-autorias, a publicação duplicada de uma fração do artigo ou de sua totalidade em outras revistas, o auto-plágio ao repetir partes de escritos anteriores, a omissão de citações, a inclusão de referências não consultadas e a auto-citação excessiva, entre outros. Os autores terão os seguintes direitos: dentro de um prazo razoável, será feita uma avaliação justa e imparcial dos seus artigos; haverá respeito na correspondência enviada e os pedidos de modificações e correções serão explicitados segundo os conceitos dos avaliadores; finalmente, o sentido do texto original não será alterado.

Os artigos colocados no Comitê Editorial da *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* devem ser inéditos. Em consequência, aqueles manuscritos que tiverem sido publicados em outras revistas ou publicações técnico-científicas não serão aceitos.

Segundo as exigências do programa Publindex de Colciencias para a categoria A2, a *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* aceita artigos originais dos seguintes tipos:

- **Artigo de pesquisa científica ou tecnológica:** documento que apresenta em detalhe os resultados de pesquisas originais. A estrutura geralmente utilizada tem quatro partes básicas: introdução, metodologia (materiais e métodos), resultados, e discussão e conclusões. Pelo menos o 18% da totalidade do artigo deve corresponder à explicação da literatura citada, enquanto um 60% das citações deve vir de artigos publicados nos últimos 10 anos.
- **Artigo de reflexão:** documento que apresenta resultados de pesquisa sobre um tema específico a partir de uma análise e interpretação crítica do autor, utilizando fontes originais. É essencial que o manuscrito inclua uma introdução de contexto que explicita um objetivo claro, uma perspectiva geral e atualizada sobre o tema, e uma proposta ou hipótese cujo desenvolvimento discursivo provenha de referências bibliográficas reconhecidas (não poderão ser admitidos artigos sem referências). É importante que as diferentes partes do texto vão encabeçadas por legendas sugestivas e relevantes.
- **Artigo de revisão:** documento sobre um tema de atualidade, geralmente escrito para um público bem informado. É resultado de uma revisão na qual os resultados de pesquisas publicadas ou inéditas em algum campo da ciência ou da tecnologia são analisados, sistematizados e integrados, a fim de explicar suas tendências de progresso e desenvolvimento. Caracteriza-se por um apoio bibliográfico cuidadoso de não menos de 50 referências.
- **Nota científica:** documento curto que apresenta resultados originais preliminares ou parciais de uma pesquisa científica ou tecnológica, os quais geralmente exigem uma rápida difusão.

## Formato e organização do texto

A extensão do artigo de pesquisa não deve exceder 5.200 palavras (incluindo literatura e tabelas), com exceção do artigo de revisão, que pode conter até 6.500 palavras. O formato da página deve ser tamanho carta, digitada em espaço duplo, fonte Times New Roman tamanho 12, margens de 3 cm na parte superior, 2 cm na parte inferior, e 2,5 cm de margens laterais esquerda e direita. As tabelas e figuras (gráficos, desenhos, diagramas, fluxogramas, fotografias e mapas) devem ser apresentadas em folhas separadas e numeradas consecutivamente (Tabela 1 ... Tabela n. Figura 1 ... Figura n, etc.). O texto e as tabelas devem ser editados em processador de texto MS-Word®. Tabelas e diagramas de frequência (colunas e pizza) devem ser incluídos dentro do arquivo do manuscrito e também enviados em seu formato original de MS-Excel®. Ao se tratar de outras figuras, como fotografias e desenhos em papel, será possível enviar os originais ou digitalizá-los e enviá-los em formato de compressão digital JPG (ou JPEG), de preferência com uma resolução de 600 × 600 dpi (no mínimo 300 dpi). Como regra geral, tabelas e figuras unicamente são aceitas em preto e branco. Os arquivos em Word, Excel e JPG que compõem o artigo deverão ser enviados ao e-mail: [gerfischer@gmail.com](mailto:gerfischer@gmail.com) (editor Gerhard Fischer).

## Idiomas, unidades e estilo

As línguas oficiais da revista são Espanhol, Inglês e Português. No caso de manuscritos escritos em Inglês, a configuração de idioma do arquivo deve corresponder ao Inglês Britânico ou Inglês Americano, cuidando de usar uma única configuração ao longo do artigo. Quanto às unidades de medida, deve-se usar exclusivamente o Sistema Métrico Decimal (SI). Todas as abreviaturas devem ser explicadas quando utilizadas pela primeira vez no texto. O estilo do manuscrito deve ser impessoal, usando-se o tempo gramatical passado na introdução, métodos e resultados.

## Título e autores

Quando o título vier em Espanhol, é obrigatória sua tradução ao Inglês, e vice-versa. Ao incluir nomes científicos de plantas ou animais, eles devem ser escritos em letra cursiva (itálica) e em minúsculas, unicamente capitulando a primeira letra do gênero e do classificador. Abaixo do título em Inglês deve-se colocar o nome(s) e sobrenome(s) do(s) autor(es), de acordo com a sua contribuição à investigação ou preparação do artigo. Na parte inferior da primeira página, ou seja, aquela que contém o título do artigo, deve-se indicar a cidade onde se localiza o patrocinador do trabalho ou a entidade para a qual eles prestam seus serviços, junto com o autor correspondente e seu e-mail.

## Resumo, abstract e palavras-chave adicionais

O resumo deve descrever brevemente o problema, os métodos utilizados, sua justificação e os resultados mais relevantes, sem exceder 250 palavras escritas em um único parágrafo. É obrigatório acompanhar o resumo com um máximo de seis palavras chave que não tenham sido utilizadas no título. O resumo (abstract) e palavras chave adicionais (additional keywords) devem ser traduzidos ao Inglês.

## Introdução

Esta seção deve descrever a situação atual do problema, sua definição e a revisão de trabalhos anteriores com ele relacionados, além dos objetivos e justificação da pesquisa. É obrigatório acompanhar os nomes comuns dos correspondentes nomes científicos e a sigla do classificador quando mencionados pela primeira vez no artigo.

## Materiais e métodos

Esta seção deve descrever de forma clara, concisa e sequencial, os materiais (plantas, animais, implementos agrícolas ou de laboratório) utilizados no desenvolvimento do trabalho, bem como os procedimentos e protocolos seguidos e o desenho escolhido para o tratamento estatístico dos dados.

## Resultados e discussão

Os resultados devem ser apresentados de uma forma lógica, objetiva e sequencial, usando-se texto, tabelas e figuras. Estes dois últimos apoios devem ser de fácil leitura e passíveis de serem interpretados de forma independente, embora devam vir sempre citados no texto. Os gráficos devem ser bidimensionais, elaborados



em branco e preto, se valendo de percentagens de preto para representar variações entre colunas. As linhas das curvas devem ir em tinta preta, tracejadas ou contínuas (----- ou —) utilizando convenções tais como: ■, □, ◆, Δ, etc. As tabelas devem ser elaboradas com poucas linhas e colunas. As médias devem ser acompanhadas de seu correspondente erro padrão. A discussão dos resultados deve ser completa e exaustiva, comparando-se os resultados com a literatura atual sobre o tópico.

## Conclusões

Esta seção apresenta os resultados mais conclusivos da investigação, ou seja, aqueles que constituem uma contribuição significativa para o avanço da temática explorada.

## Agradecimentos

Quando for considerado necessário, esta seção irá apreciar aquelas contribuições importantes na concepção, financiamento e realização da pesquisa: especialistas, empresas, entidades públicas ou privadas, e associações de profissionais ou operadores.

## Referências

Quanto às citações usadas para apoiar afirmações no texto, deve-se aplicar uniformemente o sistema autor(es) ano. Quando a publicação citada tiver três ou mais autores, mencione o nome do primeiro deles, acompanhado pela frase latina *et al.* (“e outros”) ressaltada em itálica, e pelo ano (por exemplo, García *et al.*, 2003). A lista completa das referências mencionadas deve ser incluída ao final do artigo. Os sobrenomes (acompanhados das letras iniciais dos nomes) de todos os autores devem ser registrados em ordem alfabética. Ao se citarem várias publicações do(s) mesmo(s) autor(es), elas devem ser listadas em ordem cronológica, da mais recente à mais velha. É obrigatório incluir no final de cada compromisso do DOI (*digital object identifier*) e o manuscrito deve conter pelo menos 30% de seus compromissos com este identificador. Somente fontes originais devem ser citadas. Antecipam-se alguns casos:

- **Para livros:** Autor (es), ano. Título do livro, edição, editora e cidade de publicação, páginas consultadas (pp. # - #). Exemplo: Taiz, L. e E. Zeiger. 2006. *Fisiologia Vegetal*. 4<sup>th</sup> ed. Sinauer Associates Publishers, Sunderland, MA, USA.
- **Para capítulos de livros:** Autor (es), ano. Título do capítulo, páginas consultadas (pp. # - #). Em: Nomes e sobrenomes dos compiladores (comp.) ou editores (eds.). Título do livro, edição, editora e cidade de publicação. Exemplo: Engels, C., E. Kirkby, e P. White. 2012. Mineral nutrition, yield and source-sink relationships. pp. 85-133. Em: Marschner, P. (ed.). *Marschner’s mineral nutrition of higher plants*. 3<sup>rd</sup> ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. Doi: 10.1016/B978-0-12-384905-2.00005-4
- **Para revistas:** Autor (es), ano. Título do artigo, nome abreviado da revista, volume (número), página. Exemplo: García, S., W. Clinton, L. Arreaza e R. Thibaud. 2004. Inhibitory effect of flowering and early fruit growth on leaf photosynthesis in mango. *Tree Physiol.* 24(3), 387-399. Doi: 10.1093/treephys/24.4.387
- **Para revistas eletrônicas:** Autor (es), ano. Título do artigo (online). Nome abreviado da revista. Volume (número), URL, data de acesso. Exemplo: Cannarella, C. e V. Piccioni. 2007. Innovation, diffusion and territorial inertia (online). *Int. J. Manag. Rural.* 3, <http://irm.sagepub.com/content/vol3/issue2/in01.pdf>, acessado em março de 2009.
- **Para citações da Internet:** Autor (es), ano. Título do artigo. Em: Nome da publicação eletrônica, site, portal ou página junto com seu URL, data de acesso. Exemplo: Arafat, Y. 1996. Siembra de olivos en el desierto palestino. Em: *Agricultura Tropical*, <http://agrotropical.edunet.es>, acessado em novembro de 2003.

- **Para citações de dissertações em anais de congressos, simpósios e conferências:** Autor (es). Ano. Nome da comunicação. pp # - #. Em: Título. Editora. Cidade, país (se a cidade não for capital). Exemplo: Peet, M. 2008. Desórdenes fisiológicos del fruto de tomate. p. 101. Em: Livro de resumos, Simposio Internacional de Tomate en el Trópico. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas. Villa de Leyva, Colombia.
- **Para teses:** Autor (es). Ano. Título. Tese de doutorado (ou mestrado). Instituição de ensino, cidade, país (se a cidade não for capital). Exemplo: Hernández, M. 2001. Conservación del fruto de arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh) durante la poscosecha mediante la aplicación de diferentes técnicas. Tese de doutorado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

## Sistema Internacional de Unidades (SI) ou sistema métrico

A *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* requer a utilização das unidades do SI.

- Os números sobrescritos negativos só podem ser utilizados com unidades do SI (por exemplo, kg ha<sup>-1</sup>). Não interrompa a notação das unidades do SI com palavras ou símbolos que não lhe pertencem, já que ela consiste mesmo em expressões matemáticas. Quando for necessário, deve-se reordenar a expressão de forma adequada, por exemplo assim:

P a 20 g L<sup>-1</sup>, em lugar de 20 g de P L<sup>-1</sup>, ou de 20 g de P/L.

O rendimento em peso seco foi de 5 g dia<sup>-1</sup>, em lugar de 5 g de peso seco dia<sup>-1</sup>.

Aplicaram-se 25 g ha<sup>-1</sup> de ingrediente ativo, em lugar de 25 g i.a./ha.

Cada planta recebeu 20 g ha<sup>-1</sup> de água, em lugar de 20 g H<sub>2</sub>O/ha por planta.

- A barra (/) é um símbolo que, em matemática, significa “dividido por”; em ciência é usada como um substituto da preposição “com” no sentido de “para cada” e é usado para mostrar taxas ou proporções. Utilize a barra para ligar unidades do SI com aquelas que não pertencem a este sistema (por exemplo, 10°C/h ou 10 l/vaso). Nunca use números negativos sobrescritos e a barra na mesma expressão. Se as unidades SI estiverem juntas na mesma expressão com unidades que não são do SI, use primeiro a barra e, em seguida, a palavra “por”. Nunca use a barra (/) ou a palavra “por” mais de uma vez na mesma frase, já que eles são termos equivalentes; por exemplo, ao expressar *escovadas/dia por planta*, convém re-escrever a frase: *cada planta foi escovada duas vezes por dia*. Para unidades totalmente verbais, use uma barra, como em três flores/planta ou 10 frutos/galho.
- Para citar unidades baseadas em nomes, use minúscula, como em: “um siemens representa...”. No entanto, os graus Celsius (°C) e graus Brix (°Brix) devem ser capitulados.
- Use a mesma abreviatura ou símbolo para as formas em singular ou plural de uma determinada unidade (por exemplo, 1 kg e 25 kg). Deixe um espaço entre o valor numérico e o símbolo (por exemplo, 35 g e não 35g). Numa série de medidas expressadas com a mesma variável, coloque esta ao final, como em: *entre 14 e 20°C ou linhas a 3, 6 e 9 m*.

O estilo admitido pela *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* para algumas unidades de medida está indicado na tabela de abreviaturas e símbolos (ver *ASHS Publications Style Manual*, [http://www.ashs.org/downloads/style\\_manual.pdf](http://www.ashs.org/downloads/style_manual.pdf), acessado em junho 2011; ou *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 4(1), 2010, pp. 181-184).

## SUSCRIPCIÓN

### Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas

Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad Nacional de Colombia

A.A. 14490, Bogotá-Colombia

Fax: (57) 1 - 316 5000 ext. 19041

socolhort@gmail.com, gerrfischer@gmail.com,

rcch@uptc.edu.co



---

*Nombre / Name*

---

*Documento de identidad / Identification document*

---

*Dirección / Address*

*Ciudad / City*

---

*Teléfono / Phone*

---

*Departamento / Department*

*Zona postal / Zip code*

---

*País / Country*

*E-mail*

---

*Profesión / Profession*

---

*Institución / Employer*

---

*Dirección de envío / Mailing address*

---

### Forma de pago suscriptores nacionales

Pago en efectivo o en cheque a nombre de la Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas o por consignación nacional en el Banco de Bogotá, cuenta corriente 033811761, y envío posterior de copia de recibo y formato de suscripción diligenciado al fax (57+1) 316 5000 ext. 19041.

**Valor para el año 2018** (dos números, incluyendo costos postales para el envío): Colombia: \$40.000 (pesos colombianos); América Latina y el Caribe: US\$30; Estados Unidos y Canadá: US\$50; otras regiones y países: US\$65.

Último ejemplar recibido / *Last issue mailed.*

---

*Año / Year*

*Volumen / Volume*

*Número / Issue*

*Fecha de envío / Mailing date*

---



Sección de frutales

Identificación y caracterización molecular del genoma completo de tres virus en cultivos de lulo (*Solanum quitoense*) de Antioquia (Colombia)

Identification and molecular characterization of the complete genome of three viruses infecting lulo (*Solanum quitoense*) crops in Antioquia (Colombia)  
Yuliana Gallo, Luisa Fernanda Toro, Helena Jaramillo, Pablo Andrés Gutiérrez, Mauricio Marín..... 281

Efecto de las deficiencias y excesos de fósforo, potasio y boro en la fisiología y el crecimiento de plantas de aguacate (*Persea americana*, cv. Hass)

Effect of deficiencies and excesses of phosphorus, potassium and boron on the physiology and growth of avocado (*Persea americana*, cv. Hass) plants  
María Alejandra Novoa, Diego Miranda, Luz Marina Melgarejo..... 293

Efecto del tipo de corte y tipo de envase en la conservación de piña [*Ananas comosus* (L.) Merr.] 'Oro Miel' mínimamente procesada

Effect of cutting and packaging type on the conservation of fresh-cut 'Golden' pineapple fruit [*Ananas comosus* (L.) Merr.]  
Elkin Mauricio Buitrago-Dueñas, Saul Dussán-Sarria, María Camila Rivera-Ochoa, Luis Eduardo Ordoñez-Santos..... 308

Sistema Integrado de Diagnóstico y Recomendación (DRIS) para piña (*Ananas comosus*), variedad Oro Miel (MD-2)

Diagnosis and Recommendation Integrated System (DRIS) for pineapple (*Ananas comosus*), Honey Gold variety (MD-2)  
Jenniffer López-Montoya, Jéssica Alejandra Fernández-Paz, Herney Darío Vásquez, Juan Carlos Menjivar-Flores..... 319

Estimación de la concentración de clorofila mediante métodos no destructivos en vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Riesling Becker

Chlorophyll concentration estimation using non-destructive methods in grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. Riesling Becker  
Cristian Santiago Castañeda, Pedro José Almanza-Merchán, Elberth Hernando Pinzón, Germán Eduardo Cely-Reyes, Pablo Antonio Serrano-Cely..... 329

Evaluación del uso de sistema de cobertura de malla en plantas de uva de mesa 'Thompson Seedless'

Evaluation of the use of a net coverage system in table grape vines, Thompson Seedless variety  
Manuel Salazar, Rodrigo Callejas, Luis Morales..... 338

Efecto parasítico de *Trichogramma* y del depredador *Chrysoperla* sobre huevos de *Compso viridivittatus*, plaga de *Vitis vinifera*, en laboratorio

Parasitism of *Trichogramma* and predation of *Chrysoperla* on *Compso viridivittatus* eggs, a *Vitis vinifera* pest, under laboratory conditions  
Diego Alonso Pinzón-Hamón, John Wilson Martínez-Osorio, Mayerly Alejandra Castro-López..... 348

Evaluation of the efficacy of neonicotinoid and pyrethroid insecticides in *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) populations in Colombia

Evaluación de la eficacia de insecticidas neonicotinoides y piretroides sobre poblaciones de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) en Colombia  
Augusto Ramírez-Godoy, Gina Puentes-Pérez, Hermann Restrepo-Díaz..... 358

Comportamiento poscosecha de frutos de mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) var. Arrayana: efecto de diferentes tratamientos térmicos

Postharvest behavior of mandarin fruits (*Citrus reticulata* Blanco) var. Arrayana: effect of thermal treatments  
Helber Enrique Balaguera-López, Edgar Alfonso Palacios O..... 369

Carotenoides, clorofilas y pectinas durante la maduración de variedades de guayaba (*Psidium guajava* L.) de Santander, Colombia

Carotenoids, chlorophylls and pectins during ripening of guava (*Psidium guajava* L.) from Santander, Colombia  
Jacqueline Guavita-Vargas, Lizeth M. Avellaneda-Torres, María Elena Solarte, Luz Marina Melgarejo..... 379

Preliminary evaluation of associated viruses in production systems of cape gooseberry, purple passion fruit, and rose

Evaluación preliminar de virus asociados a sistemas productivos de uchuva, gulupa y rosa  
Joseph Cutler, Juliane Langer, Susanne Von Barga, Orlando Acosta-Losada, Fánor Casiera-Posada, Adriana Castañeda-Cárdenas, Mónica Betancourt-Vásquez, Wilmer Cuellar, Eduardo Arvydas-Stasiukynas, Denise Altenbach, Carmen Büttner..... 390

Desenvolvimento e produção de melão Cantaloupe em função do espaçamento e ambientes de cultivo no Cerrado brasileiro

Development and production of Cantaloupe melon as a function of plant spacing and growing environments in the Brazilian Cerrado  
Eduardo Pradi Vendruscolo, Alexander Seleguini, Luiz Fernandes Cardoso Campos, Aliny Heloisa Alcântara Rodrigues, Sebastião Ferreira de Lima..... 397

Micropropagation protocol for the wild Brazilian greenberry (*Rubus erythroclados*)

Protocolo de micropropagación de mora-verde (*Rubus erythroclados*) nativa del Brasil  
Paulo Mauricio Centenaro Bueno, Luiz Antonio Biasi, Mauro Brasil Dias Tofaneli..... 405

Sección de hortalizas

Productive and qualitative performance of tomato plants as a function of the application of plant growth regulators and mineral nutrients

Desempeño productivo y cualitativo de plantas de tomate en relación con la aplicación de reguladores de crecimiento y nutrientes minerales  
Marília Caixeta Sousa, Luan Fernando Ormond Sobreira Rodrigues, Mônica Bartira da Silva, Janaina Oliveira Cruz, Maria Silvia Diamante, Bruno Novaes Menezes Martins, Lilian Massaro Simonetti, João Domingos Rodrigues..... 416

Interaction between biological and chemistry fungicides and tomato pollinators

Interacción entre fungicidas biológicos y químicos con polinizadores de tomate  
Carlos de Melo e Silva-Neto, Anna Clara Chaves Ribeiro, Flaviana Lima Gomes, Jordana Guimarães Neves, Aníela Pilar Campos de Melo, Francine Neves Calil, Abadia dos Reis Nascimento, Edivani Villaron Franceschinelli..... 425

Detección de plantas asintomáticas de *Solanum lycopersicum* L. infectadas con *Fusarium oxysporum* usando espectroscopia de reflectancia VIS

Detection of asymptomatic *Solanum lycopersicum* L. plants infected with *Fusarium oxysporum* using reflectance VIS spectroscopy  
Juan Carlos Marín-Ortiz, Lilliana María Hoyos-Carvajal, Verónica Botero-Fernández..... 436

Água tratada magneticamente para irrigação: efeitos na produção e eficiência do uso da água na cultura da cenoura (*Daucus carota* L.)

Magnetically treated water for irrigation: effects on production and efficiency of water use in carrot (*Daucus carota* L.) crop  
Fernando Ferrari Putti, Luis Roberto Almeida Gabriel Filho, Camila Pires Cremasco, Josué Ferreira Silva Junior..... 447

Acumulación de biomasa en yuca (*Manihot esculenta* C.) ante la respuesta a la aplicación de fertilizantes NPK y biofertilizantes en condiciones de invernadero en dos tipos de suelo

Biomass accumulation response of cassava (*Manihot esculenta* C.) to NPK fertilization and biofertilizers in two soil types under greenhouse conditions  
Jazmín Vanessa Pérez-Pazos, Lily Lorena Luna-Castellanos, Oscar Burbano-Figueroa..... 456

Efecto del compost de residuos orgánicos domiciliarios, vegetales y estiércol en el crecimiento de lechuga

Effect of organic residue compost made from household waste, plant residues and manure on the growth of lettuce  
Daianni Ariane da Costa Ferreira, Nildo da Silva Dias, Ana Kaline da Costa Ferreira, Cybelle Barbosa e Lima Vasconcelos, Francisco Souto de Sousa Junior, Vania Christina Nascimento Porto, Cleyton dos Santos Fernandes, Manuel Antonio Navarro Vásquez..... 464

Sección de plantas ornamentales

Rice husk substrates and pruning time for gypsophila production

Sustratos de cascarilla de arroz y momento de la poda en la producción de gypsophila  
Daniela Höhn, Roberta Marins Nogueira Peil, Lais Perin, Priscila Monalisa Marchi, Paulo Roberto Grolli, Albertina Radtke Wieth..... 475

Sección de plantas aromáticas, medicinales y condimentarias

Floral capitula and essential oil production analysis of chamomile (*Chamomilla recutita*) cultivars at different times of harvest

Análisis de la producción de capítulos florales y aceite esencial de cultivares de manzanilla (*Chamomilla recutita*) en diferentes épocas de cosecha  
Milton S. Matsushita, Cicero Deschamps, Cirino Corrêa Júnior, Marília P. Machado..... 484

Propagation of three native Brazilian *Piper* species by cuttings and indole butyric acid

Propagación de tres especies nativas brasileñas de *Piper* usando estacas y ácido indolbutírico  
Aurea Portes Ferriani, Cicero Deschamps, Wanderlei do Amaral, Luiz Everson da Silva..... 491

Artículo de otras especies

Efecto de cuatro inhibidores de etileno en la maduración del fruto de café (*Coffea arabica* L.) durante precosecha

Effects of four ethylene inhibitors on the ripening of coffee (*Coffea arabica* L.) fruits during the pre-harvest period  
Carlos Andrés Unigarro, Claudia Patricia Flórez, Carlos Eugenio Oliveros, Myriam Cañón..... 500

Leaf area and intermittent misting on hop plants propagation by stem cuttings

Área foliar y nebulización intermitente en la propagación de lúpulo por estacas de tallo  
Erik Nunes Gomes, Marília Pereira Machado, José Miola, Cicero Deschamps..... 508

Nota científica

Development and root morphology of passion fruit in different substrates

Desarrollo y morfología de la raíz del maracujá en diferentes sustratos  
Karmine Dias do Valle, Laisse Danielle Pereira, Moab Acácio Barbosa, Vanessa Brenda Souza Chaves, Pedro Henrique Magalhães de Souza, Edésio Fialho dos Reis, Alejandro Hurtado-Salazar, Danielle Fabiola Pereira da Silva..... 514

Política editorial | Instrucciones para autores 521

Suscripción 537