

REBIOL

REVISTA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA



Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional de Trujillo

Volumen 34, Número 1

Enero - Junio, 2014





Las Líneas de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo

Mediante RD N° 184-2011-Fac.CC.BB. se aprobó las Líneas de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas, que habían sido previamente propuestas, discutidas, aprobadas y codificadas en un plenario en concordancia con lo propuesto en el Plan Nacional de Desarrollo. Las Líneas concordadas fueron: (i) Conservación y caracterización de germoplasma para el desarrollo de variedades mejoradas en calidad y producción, (ii) Caracterización y control integrado de las principales plagas y enfermedades, (iii) Cultivos andinos, frutales y plantas medicinales y (iv) Fermentaciones industriales, en el Sector Agricultura, Agroindustria y Agro-exportación; (i) Uso de tecnología para el uso sostenible de pastos y recursos hídricos y (ii) Prevención, control y erradicación de enfermedades endémicas, en el Sector Pecuario; (i) Mejoramiento de tecnologías de transformación y procesamiento de especies marinas para consumo humano directo y (ii) Aplicación de tecnologías en la calidad de moluscos bivalvos, en el Sector Acuicultura y Pesca; (i) Epidemiología y prevención de problemas de salud de mayor impacto y (ii) Nutrición y seguridad alimentaria, en el Sector Salud y Nutrición; (i) Conservación de la biodiversidad biológica; (ii) Biorremediación de suelos, agua y ambiente contaminados y (iii) Desarrollar y transferir tecnologías para la producción más limpia y la ecoeficiencia, en el Sector Biodiversidad y Calidad Ambiental; y (i) Inventario y evaluación de recursos hídricos convencionales y de fuentes hídricas no convencionales y (ii) Desarrollo de sistemas de gestión técnica para la asignación en el Sector Recursos Hídricos.

Sin embargo, la investigación ejecutada por docentes y alumnos de la Facultad no tuvo en cuenta el total de Líneas propuestas y, en algunos casos, ninguna de ellas. Consideramos, entonces, que la presente gestión debería ratificar o modificar las mencionadas Líneas puesto que formalmente siguen vigentes, hacer conocer su existencia a través del Sistema de Información y Comunicaciones y, en lo posible, establecer la concordancia con las investigaciones propuestas a comienzo de año por docentes y en su oportunidad por alumnos en los proyectos de Tesis, a fin de resolver lo que se ha venido siendo un prolongado reclamo: solucionar mediante la investigación los problemas de la sociedad.

Foto de la portada: "Vizcacha". *Lagidium peruanum* Meyen, 1833 Orden Rodentia, Familia Chinchillidae. La "vizcacha" se alimenta de frutos de cactus. Foto tomada en la Loma Cerro Campana, a 300 m de altitud. Se encuentra en Preocupación Menor (LC) según la UICN. Foto Luis Pollack Velásquez



Contenido/Contents

ARTÍCULOS ORIGINALES/ORIGINAL PAPERS

- **Efecto alelopático del extracto acuoso de hojas de *Helianthus annuus* sobre la germinación y crecimiento de plántulas de *Setaria unguolata* y *Chenopodium murale*.** / Allelopathic effect of aqueous extract of *Helianthus annuus* leaves on germination and seedling growth of *Chenopodium murale* and *Setaria unguolata*. Marlene Rodríguez espejo, Julio Chico Ruiz y Orlando Chávez Williams. Pág. 5
- **Efecto de los ácidos húmico y fúlvico en el crecimiento de *Passiflora ligularis* cultivada en condiciones de invernadero.** / Humic and fulvic acids effect on growth of *Passiflora ligularis* grown under greenhouse. Mercedes Chaman Medina, Roger Veneros Terrones, Edita Araujo Castillo, Aureliano Ramírez Cruz, Jose Hidalgo Rodríguez, Bernabé S. Luis Alaya y Cynthia Ramos Otiniano. Pág. 13
- **Contenido de prolina en *Solanum lycopersicum* pretratado con glicina betaina y sometido a estrés salino.** / Proline content in *Solanum lycopersicum* pretreated with glycine betaine under salt stress. Manuel F. Pesantes Vera y Juan Rodríguez Soto. Pág. 19
- **Efecto diurético de la ortiga, *Urtica dioica*, y los niveles de excreción de sodio en *Rattus rattus albinus*.** / Diuretic effect of *Urtica dioica* and excretion levels of sodium in *Rattus rattus albinus*. Segundo F. Castillo Viera y Ericson F. Castillo Saavedra. Pág. 26
- **Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad y estabilidad de pectinasas producidas por *Bacillus spp.*** / Temperature and pH effect on the activity and stability of pectinase produced by *Bacillus spp.* Julio C. Arellano Barragán, Steban A. Ilich Zerpa, Marco L. Salazar Castillo, Icela M. Rodríguez Haro, Willman N. Alarcón Gutiérrez y Fantasía O. Gasco Álvarez. Pág. 33
- **Efecto de *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana* sobre el ácaro *Panonychus citri* en condiciones de laboratorio.** / Effect of *Beauveria bassiana* and *Lecanicillium lecanii* on mite *Panonychus citri* under laboratory conditions. Erika P. Alayo-Aguirre y Juan H. Wilson-Krugg. Pág. 42
- **Producción de anticuerpos en *Oryctolagus cuniculus* inmunizados con cultivos rizobianos nativos y cepas patrón.** / Production of antibodies in *Oryctolagus cuniculus* immunized with native rhizobial strains crops and pattern. Bertha Soriano Bernilla, Adalberto Gonzales Varas, Manuela Luján Velásquez, Jaime Agreda Gaitán y Eduardo Muñoz Ganoza. Pág. 51

- Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* en la supervivencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Salmonella paratyphi* y *Salmonella enteritidis* en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada. / Effect of *Origanum vulgare* essential oil on survival of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Salmonella paratyphi* and *Salmonella enteritidis* in pasteurized and refrigerated meat pork. Pedro Alvarado Salinas, María Vásquez Valles, Icela Rodríguez Haro, Wilton Saldaña Sevilla, Wilson Reyes Lázaro y Araceli Vargas Huamán. Pág. 57
- *Trypanosoma cruzi*: características del crecimiento y susceptibilidad a violeta de genciana “in vitro” de dos poblaciones nativas de Zaña, Lambayeque, Perú. / *Trypanosoma cruzi*: in vitro ground features and susceptibility to gentian violet of two native populations from Zaña, Lambayeque, Peru. Cristian Aurazo¹, Judith Roldán² y César A. Jara..... Pág. 69
- Ciclo biológico y comportamiento de *Marmara gulosa* (Lep.: Gracillariidae) en el cultivo de *Punica granatum* en Alto Salaverry (La Libertad, Perú). 2013. / Biological cycle and *Marmara gulosa* (Lep.: Gracillariidae) behavior in the culture of *Punica granatum* from Alto Salaverry (La Libertad, Peru).2013. Gaspar Ayquipa Aycho¹, Roberto Rodríguez Rodríguez¹, Ruperto Farroñan Montalvo², Marlon Hoyos Cerna³ y Emeli Haro Valverde..... Pág. 76

POLITICA EDITORIAL

- Guía para los autores. Pág. 82



Efecto alelopático del extracto acuoso de hojas de *Helianthus annuus* sobre la germinación y crecimiento de plántulas de *Setaria unguolata* y *Chenopodium murale*

Allelopathic effect of aqueous extract of *Helianthus annuus* leaves on germination and seedling growth of *Chenopodium murale* and *Setaria unguolata*

Marlene Rodríguez espejo, Julio Chico Ruiz y Orlando Chávez Williams
Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú

RESUMEN

Se determinó el efecto alelopático del extracto acuoso, a las concentraciones de 25, 50 y 100%, de hojas de *Helianthus annuus* sobre la germinación y crecimiento de plántulas de *Setaria unguolata* "rabo de zorro" y *Chenopodium murale* "hierba del gallinazo" bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Se seleccionó 600 semillas de ambas especies, teniendo en cuenta su integridad física y tamaño, las que fueron germinadas en placas de Petri, razón de 150 semillas en grupos de 50 unidades por tratamiento, con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, a $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, para evaluar el porcentaje de germinación, la longitud de raíz e hipocótilo, a los 07 y 15 días de crecimiento. Se encontró que el extracto en *S. unguolata*, a la concentración del 100%, ocasionó efecto inhibitorio en la germinación y crecimiento de raíz y de hipocótilo y en *Ch. murale*, a las concentraciones de 50% y 100%, causó disminución significativa, tanto en el porcentaje de germinación como longitud de raíz y de hipocotilo.

Palabra clave: Aleopatía, germinación, *Helianthus annuus*, *Setaria unguolata*, *Chenopodium murale*.

ABSTRACT

Allelopathic effect of aqueous extract, at concentrations of 25, 50 and 100 %, *Helianthus annuus* leaves on germination and seedling growth of *Setaria unguolata* "fox tail" and *Chenopodium murale* "vulture grass" was determined under a completely randomized design with three replications. 600 seeds of both species were selected, taking into account their physical integrity and size, which were germinated in Petri dishes, the rate of 150 seeds in groups of 50 units per treatment, with a photoperiod of 12 hours light and 12 hours of dark at $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, to evaluate the germination percentage, root length and hypocotyl, to 07 and 15 days of growth. We found that *S. unguolata* extract at 100% concentration, caused inhibitory effect on the germination and growth of root and hypocotyl and *Ch. murale*, at concentrations of 50% and 100% , caused significant decrease both germination percentage and root length and hypocotyl.

Keyword: Allelopathy, germination, *Helianthus annuus*, *Setaria unguolata*, *Chenopodium murale*.

INTRODUCCIÓN

La alelopatía es un término que define un fenómeno químico ecológico en el que los metabolitos secundarios producidos por una especie vegetal se liberan e interfieren con la germinación y el crecimiento de otras plantas en el mismo entorno^{1,2}. En este contexto, los aleloquímicos son metabolitos secundarios que se lixivian de las plantas por diferentes vías, alterando las relaciones entre las plantas en la naturaleza, pudiendo ser sus efectos modificados por microorganismos en el suelo, pudiendo afectar seriamente el crecimiento y productividad de los cultivos; sin embargo, en décadas recientes, la alelopatía ha probado ser una alternativa como método de control de plagas, enfermedades y malezas^{1,3,4,5}.

En la actualidad ha habido un creciente interés en la explotación de la alelopatía como una alternativa estratégica, principalmente para el control de malezas, insectos y enfermedades, ya que varias clases de sustancias naturales como los taninos, glucósidos cianogénicos, alcaloides, sesquiterpenos, flavonoides y ácidos fenólicos tienen actividad sobre la inhibición o retardo total de la germinación de semillas, crecimiento estancado, la lesión del sistema de raíces, clorosis, marchitamiento y muerte de plantas. Estos productos están presentes en todos los órganos de la planta, tales como hojas, rizomas, raíces y semillas, entre otros, aunque sin una distribución uniforme y las variaciones dependen de la especie y el órgano de la planta analizada^{1,9}.

Helianthus annuus es una especie de amplia distribución en la costa que contiene los terpenoides: monoterpenos, (pineno, camfeno, α -fellandreno, α -terpineno, *p*-cimeno, limoneno, borneol y terpinen-4-ol) bisnorsesquiterpenos, sesquiterpenos, (heliannuoles) y heliespironas. Dichos compuestos tienen, especial interés por las estructura lactonas sesquiterpénicas, diterpenos, triterpenos y esteroides, así como, ácidos grasos y los compuestos fenólicos: flavonoides, cumarinas y fenoles simples flavonoides, muchos de ellos con propiedades alelopáticas⁹.

Se evaluaron en plántulas de linaza las influencias alelopáticas de extractos acuosos de girasol y sus efectos en la germinación y el crecimiento de las plántulas, donde se encontró que la germinación; las masas fresca y seca de las raíces aumentaron las longitudes a una concentración de 25%. Estos parámetros mostraron disminución cuando se aumentaron las concentraciones a 50, 75 y 100% en los tratamientos; el análisis químico también indicó que las plántulas crecidas en 25 % de extractos acuosos de girasol tenían el porcentaje de proteína, potasio, fósforo y almidón más alto con respecto al testigo⁹. Se ha concluido que el extracto acuoso del girasol estimula a la más baja concentración y el efecto inhibitorio a las concentraciones más altas. Existen trabajos que muestran el comportamiento alelopático de cultivos como el girasol en la germinación y desarrollo de algunas malezas bajo condiciones de campo controladas en diferentes épocas del año, obteniendo un efecto inhibitorio de las malezas tanto en período de primavera como en el de invierno^{4,6,8}.

En el Perú, las malas hierbas o malezas, entre ellas *Setaria unguolata* “rabo de zorro” y *Chenopodium murale* “hierba de gallinazo”, asociadas a los cultivos de interés comercial constituyen serios problemas para los agricultores, pero, al mismo tiempo, forman parte importante de la biodiversidad vegetal de nuestro territorio y tiene valor en sí misma y por su contribución al mantenimiento de aves e insectos. Tienen amplia distribución geográfica⁸ y se hace necesario el uso de medidas alternativas que posibiliten un control efectivo rápido y seguro utilizándose recursos naturales sin que el medio ambiente sea perjudicado. Una de ellas es, el uso de sustancias alelopáticas; por ello, se planteó una investigación orientada a determinar el efecto alelopático del extracto acuoso de hojas y raíces de *H. annuus* sobre la germinación y crecimiento de plántulas de *Ch. murale* y *S. unguolata*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material de estudio

- Hojas jóvenes de plantas de *H. annuus* “girasol” procedentes del campo experimental de Fisiología Vegetal. Ciudad Universitaria, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo (UNT). Perú.

- Semillas de *S. unguolata* “cola de zorro” y *Ch. murale* “hierba del gallinzo” recolectadas del Centro Experimental de animales menores CEP CAM-UNT. La Libertad.

El material botánico fue determinado taxonómicamente en el Herbarium Truxilensis de la UNT.

Preparación del extracto

Las hojas se secan bajo sombra por 72 horas, luego fueron trituradas hasta obtener una muestra de 400 g. Posteriormente, se preparó el extracto puro usando una licuadora con agua destilada en una proporción 1:8 (1 g de *H. anus* + 8 mL de agua destilada) y se centrifugó por 5 min, a 3000 rpm, obteniéndose el sobrenadante a partir del cual se prepararon soluciones al 0%, 25%, 50%, 100%.

Bioensayos (germinación de la maleza sometida a diferentes concentraciones de extracto)

600 semillas de *S. unguolata* y *Ch. murale* fueron seleccionadas teniendo en cuenta su integridad física y tamaño, las que fueron germinadas en cajas Petri, por triplicado, conteniendo en su base papel toalla. Estas fueron distribuidas a razón de 150 semillas, en grupos de 50 unidades por tratamiento (0%, 25%, 50%, 100%). Todos los tratamientos fueron sometidos a fotoperiodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, a 23 ± 2 °C, bajo un diseño completamente al azar, con cuatro tratamientos y tres repeticiones, incluyendo un testigo. Se evaluó el porcentaje de germinación de la semillas considerando germinadas las que presentan una longitud radicular de 0.1 mm, al mismo tiempo, se midió la longitud del hipocótilo a los siete y 15 días de crecimiento.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron tratados estadísticamente, porcentajes, mediante promedios, así mismo se realizara un análisis de varianza y para determinar diferencias significativas entre los tratamientos se aplicara la prueba Tukey, con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS

Se encontró que, a medida que se incrementa la concentración del extracto acuoso de *H. annuus* en las semillas de las dos especies éste ocasiona disminución e inhibición en los porcentajes de germinación de *Ch. murale* (0%) y *S. unguolata* (14%), respectivamente, en el tratamiento del 100% con respecto al control, en el cual la primera especie obtiene un porcentaje de germinación de 86% y la segunda del 94%, respectivamente (Tabla 1).

A lo largo de la evaluación diaria, el porcentaje de germinación acumulada en *S. unguolata* disminuye a partir del tercer día de evaluación en los tratamientos de 25% y 50% y de inhibición de la germinación desde el inicio en el tratamiento al 100% con respecto al control, a diferencia de lo suscitado en *Ch. murale* en el cual el porcentaje de germinación acumulado en el tratamiento del 25% se da desde el inicio de la experiencia, sin embargo en los tratamientos de 50% y 100% ocasionan un retraso en la germinación empezando al cuarto día con respecto al control (Fig. 1).

Con respecto a la longitud de raíz y de hipocótilo en *S. unguolata* (Figs. 2 y 3), así como de *Ch. murale* (Figs. 5 y 6), la influencia de las diferentes concentraciones del extracto acuoso del girasol produce efectos, siendo más marcado a partir del tratamiento del 50% en *Ch. murale* y más agresivo en *S. unguolata* en el tratamiento al 100% donde hubo inhibición del crecimiento de raíz y del hipocótilo con respecto al control, observándose notoriamente a los quince días de evaluación.

Tabla. 1. Efecto del extracto acuoso de *Helianthus annuus* en el porcentaje de germinación promedio de semillas de las especies *Setaria unguolata* y *Chenopodium murale* en las concentraciones de 0%, 25%, 50% y 100%

PORCENTAJE DE GERMINACIÓN				
TRATAMIENTOS				
SEMILLAS	0%	25%	50%	100%
<i>Setaria unguolata</i>	86	54	26	0
<i>Chenopodium murale</i>	94	78	58	14

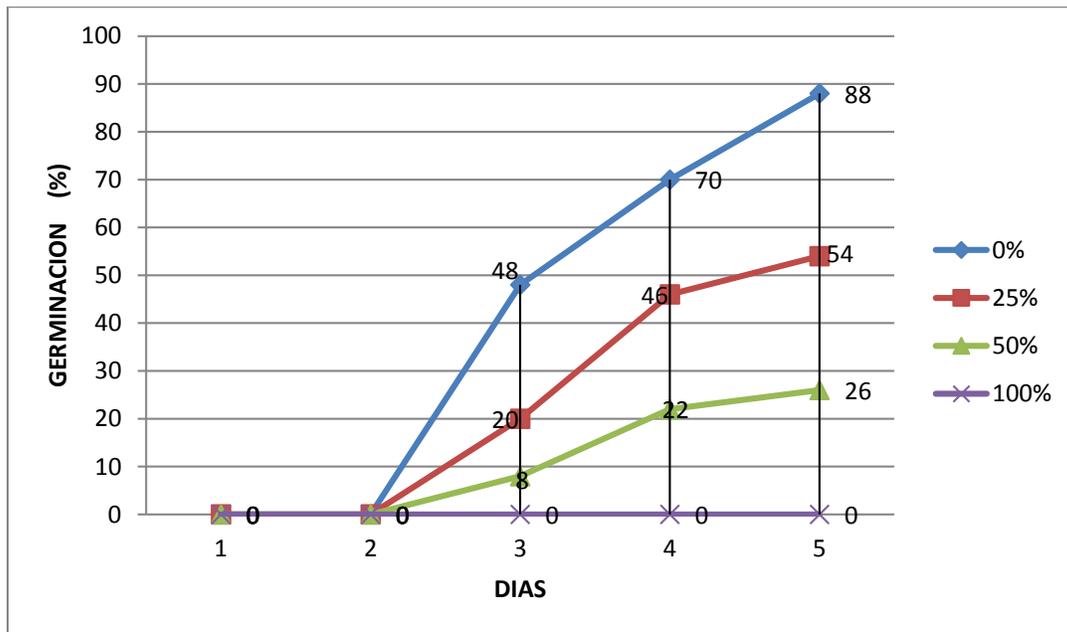


Fig.1. Porcentaje de germinación acumulada diaria de semillas de *Setaria unguolata* por efecto del extracto acuoso de *Helianthus annuus* en las concentraciones de 0, 25%, 50% y 100%.

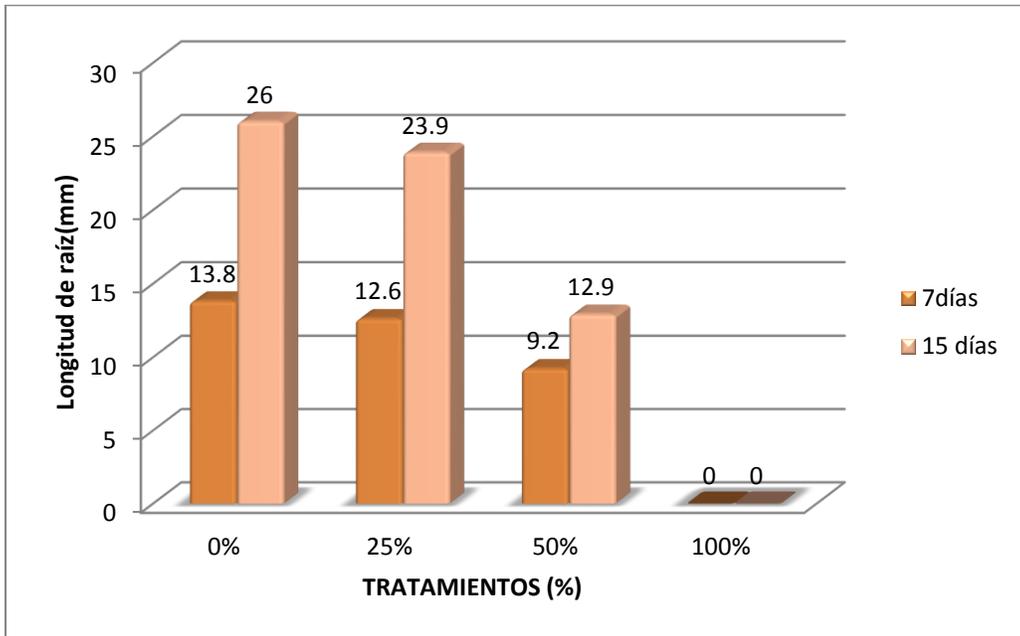


Fig. 2. Longitud de la raíz de *Setaria unguolata* por efecto de los tratamientos de 0%, 25%, 50% y 100% del extracto acuoso de *Helianthus annuus* "girasol" a los 7 y 15 días de evaluación.

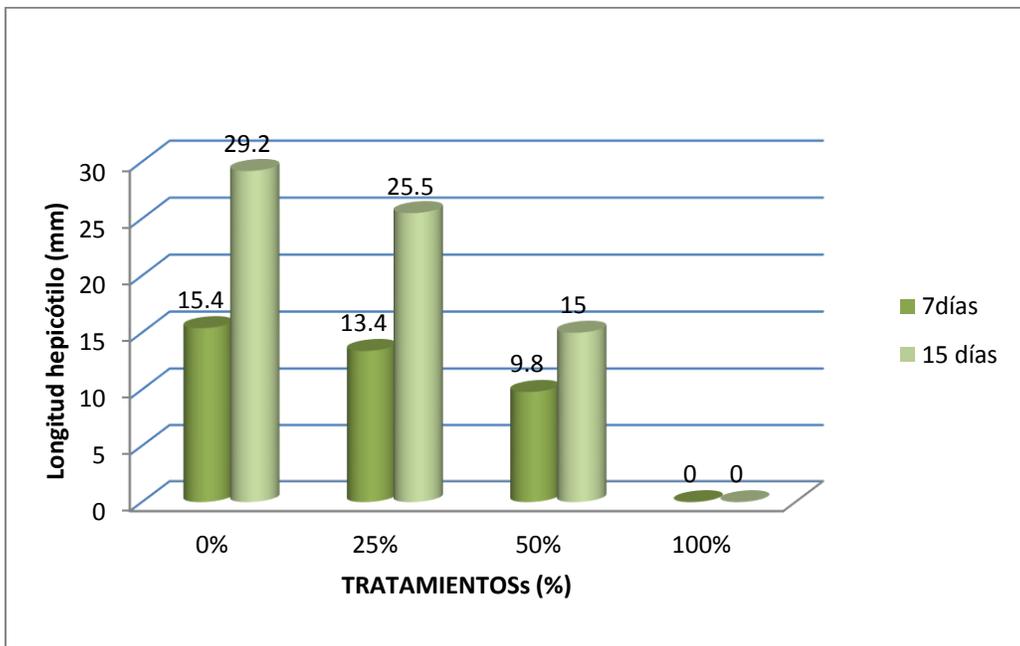


Fig.3. Longitud de la hipocótilo de *Setaria unguolata* por efecto de los tratamientos de 0%, 25%, 50% y 100% del extracto acuoso de *Helianthus annuus* "girasol" a los 7 y 15 días de evaluación.

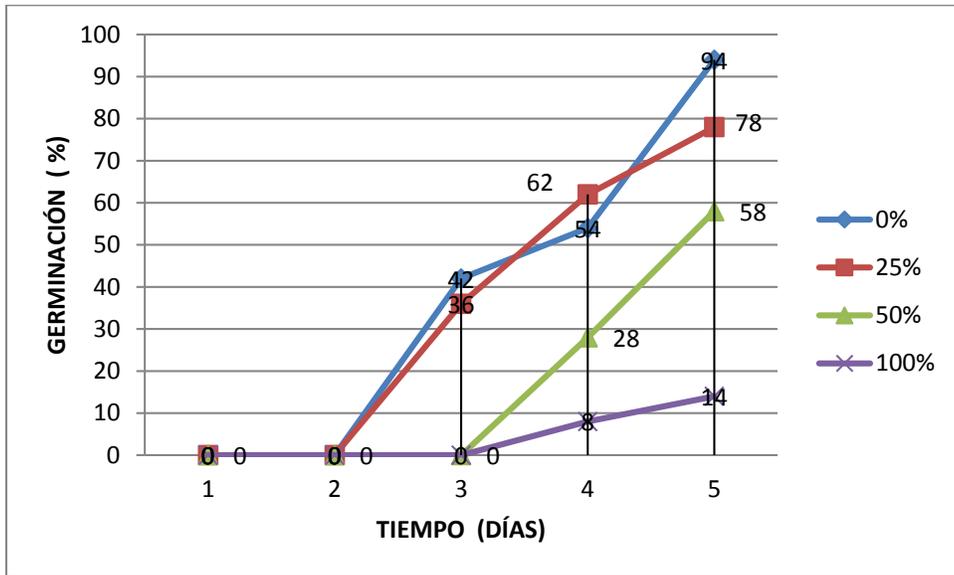


Fig. 4. Porcentaje de germinación acumulada diaria de semillas de *Chenopodium murale* por efecto del extracto acuoso de *Helianthus annuus* en las concentraciones de 0, 25%, 50% y 100%.

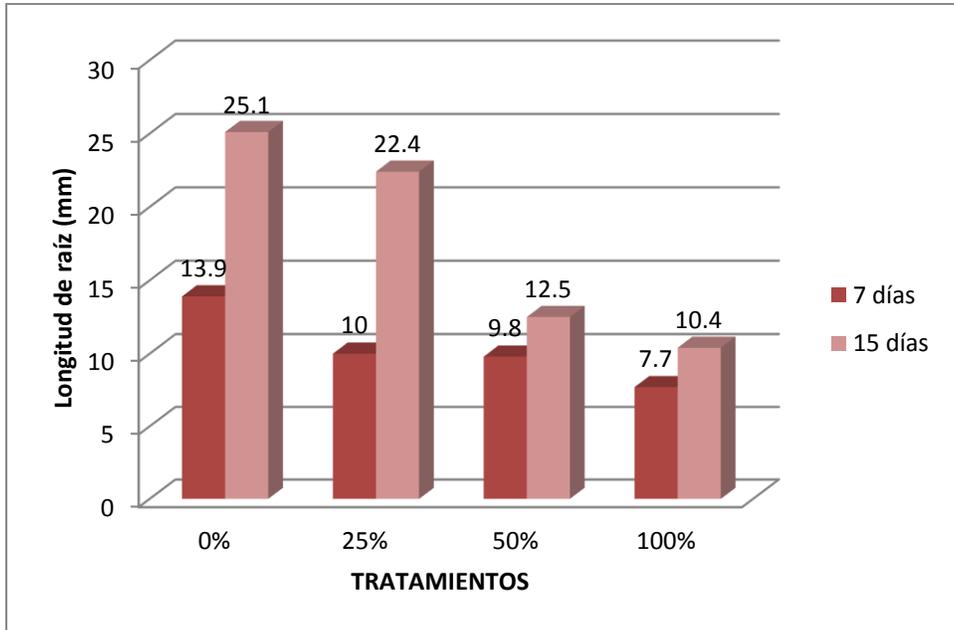


Fig. 5. Longitud de la raíz de *Ch.enopodium murale* por efecto de los diferentes tratamientos del extracto acuoso de *Helianthus annuus* "girasol". A los 7 y 15 días de evaluación

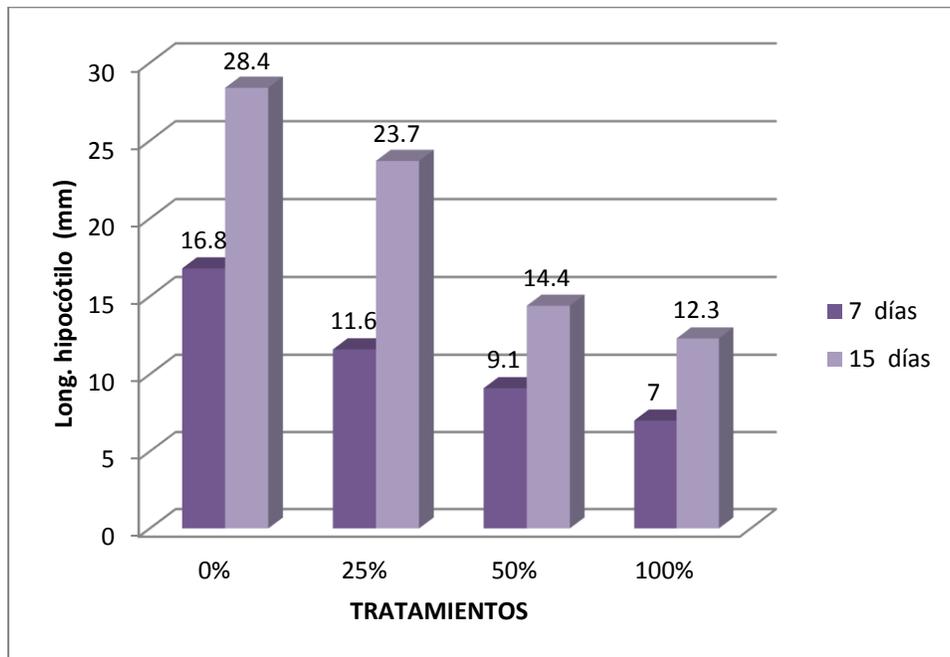


Fig. 6. Longitud de hipocótilo de *Chenopodium murale* por efecto de los diferentes tratamientos del extracto acuoso de *Helianthus annuus* “girasol”. A los 7 y 15 días de evaluación

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran que a medida que se incrementa la concentración del extracto acuoso de *H. annuus* el porcentaje de germinación de las semillas de *S. unguilata* llega a inhibirse en el último tratamiento 100% y *Ch. murale* muestra una marcada reducción en el porcentaje de germinación; los efectos observados responden a una relación dependiente de la dosis de acuerdo con el aumento de la concentración del extracto acuoso de “girasol”. Así mismo al comparar los resultados del número de semillas germinadas entre el tratamiento y el testigo, puede notarse claramente cómo desde el primer momento el número de semillas germinadas en el testigo supera ampliamente las de los tratamientos; y al final del experimento, el número de semillas germinadas acumuladas en los tratamientos se encuentran en proporciones 1:3:8 (tratamiento: testigo) en ambas especies respectivamente al finalizar la evaluación. La inhibición observada en la germinación del *S. unguilata* al 100% así como la disminución en el porcentaje de germinación, se debería a la influencia alelopática de los extractos acuosos de *H. annuus* el cual puede inhibir la germinación^{9,10,11}.

Los parámetros de longitud de raíz y de hipocótilo de las plántulas de *S. unguilata* y *Ch. ambrosoides* se nota que hay una disminución e inhibición en los valores de estas variables en los tratamientos en comparación con el testigo, es decir, que la acción alelopática del extracto de girasol al 50% y 100% de concentración influyó en el crecimiento significativamente. Estos resultados coinciden con otras investigaciones obtenidas al estudiar los efectos de extractos de “girasol” en la germinación y el desarrollo de arvenses asociadas a cultivos que comprobaron el carácter inhibitorio del extracto de *H. annuus* sobre *Sorghum halepense*, *Euforbia heterophylla*, *Cyperus rotundus*.^{3,10,11}. Dicho efecto muestra una vez más su influencia alelopática el cual puede inhibir hasta el crecimiento en longitud tanto de la raíz como del hipocótilo, sin embargo, puede aumentar su longitud en concentraciones bajas, y disminuirlo con el aumento de las concentraciones. Por otra parte tal efecto alelopático que presenta *H. annuus* se debería a

que presenta ciertos principios activos como el ácido cinámico y sus derivados que han sido identificados como inhibidores de la germinación de gran variedad de cultivos y malezas. Así mismo los efectos tóxicos de estos compuestos son pronunciados debido a su larga persistencia en el suelo.

Como se puede apreciar *H. annuus* está considerado como una planta de fuerte efecto alelopático de inhibición contra malezas, e incluso sobre la germinación y desarrollo de plántulas de varios cultivos, en pruebas de laboratorio con los extractos de su follaje, especie que

CONCLUSIÓN

- El extracto acuoso de *Helianthus annuus* en *Setaria unguolata* ocasiona un efecto inhibitorio en la germinación y crecimiento de raíz y de hipocótilo a la concentración del 100% y en *Ch. murale* causa disminución significativa en las concentraciones de 50% y 100% tanto en el porcentaje de germinación como longitud de raíz y de hipocotilo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida F. Alelopatía e as plantas. Londrina: IAPAR. 1988.
2. Guenzl WD, McCalla TM, Norstadt FA. Presencia y la persistencia de sustancias fitotóxicas en trigo, avena, maíz, sorgo y residuos Agron J 1967; 59: 163-165.
3. Magiero E, Assmann J, Marches J. Efecto alelopático de *Artemisia annua* L. germinación y el desarrollo inicial de las plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) y productos lácteos (*Euphorbia heterophylla* L.). Rev Bras Plantas Medicinales 2009; 11: 317-324.
4. Chung F, Miller H. La influencia alelopático de nueve extractos de hierba de forraje en la germinación y crecimiento de plántulas de alfalfa. Agron J 1995; 87: 767-772.
5. Duke S. Microbially produced phytotoxins as herbicides –a perspective. In: Putnam A. R., and C. S. Tang (eds). The Science of Allelopathy. John Wiley&Sons, Inc., New York, USA. 1986; pp.287–304.
6. Rice E. Allelopathy. 2nd ed. Academic Press, Orlando, FL. 1984.
7. Fay P, Duke W. Una evaluación del potencial alelopático en el caso *Avena sativa* germoplasma WeedScience 1977; 5: 224-228.
8. Mostacero J, Mejia F, Gamarra Y. Fanerógamas del Perú, taxonomía utilidad y ecogeografía. 2009.
9. Ghafar S, Qureshi B. Allelopathic effects of sunflower (*Helianthus annuus*) on germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L). Pakistan J Biol Sci 2009; 3(8): 121-130
10. Bashir U, Javaid A, Rukhsana B. Allelopathic Effects of Sunflower Residue on Growth of Rice and Subsequent Wheat Crop. Chile J Agricul Res 2012; 72(3): 326-331.
11. Puente M. Potencial alelopático del girasol (*Helianthus annuus* L.): una vía alternativa en el manejo de herbicidas para una agricultura sustentable. 1999.
12. Sampietro D. Alelopatía Concepto Características. Metodología de estudio e importancia. Cátedra de Fitoquímica. Instituto de Estudios Vegetales "Dr. Antonio Sampietro. Universidad Nacional Tucuman. Tucumán. Argentina. 2009.



Efecto de los ácidos húmico y fúlvico en el crecimiento de *Passiflora ligularis* cultivada en condiciones de invernadero

Humic and fulvic acids effect on growth of *Passiflora ligularis* grown under greenhouse

Roger Veneros Terrones, Mercedes Chaman Medina, Edita Araujo Castillo y Florencio Ramírez Cruz

Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

RESUMEN

Se evaluó el efecto de los ácidos húmico y fúlvico en el crecimiento de plantas de *Passiflora ligularis* “granadilla” en condiciones ecológicas estables (invernadero). Para llevar a cabo el ensayo, plantas de granadilla de 10 cm de altura fueron colocadas en macetas de plástico con sustrato arena y musgo, para establecer cuatro tratamientos: el primero, que recibió solamente solución nutritiva la Molina y el resto, que recibieron, además de la solución antes mencionada, ácidos húmico y fúlvico en las siguientes proporciones (T2= 1% T3= 3%), respectivamente, con tres repeticiones. Los ácidos húmico y fúlvico influenciaron en el crecimiento de las plantas de granadilla ($p < 0,05$), con un incremento en el T3 de 48.35% y 57.46% en peso fresco y seco de plantas, respectivamente; 51.66% en longitud de planta y 45.98 % en diámetro de tallo y 55.68 % en área foliar respecto al control (T1). Se concluye que los ácidos húmico y fúlvico incrementan el peso seco, la longitud y área foliar de *P. ligularis*.

Palabras claves: Acidos húmico y fúlvico, *Passiflora ligularis*, crecimiento

ABSTRACT

The effect of humic and fulvic acids on growth of *Passiflora ligularis* under stable environmental conditions (greenhouse) were evaluated. To perform the assay, plants of 10 cm in length were placed in plastic pots with sand substrate and moss, to establish four treatments: the first, which received only nutrient solution Molina and the rest, who were also of the above solution, humic and fulvic acids in the following proportions (1% T2 = T3 = 3%), respectively, with three replicates. The humic and fulvic acids influenced the plant growth of fruit ($p < 0.05$), an increase in Q3, 48.35% and 57.46% in fresh and dry weight of plants, respectively; In length 51.66% and 45.98% in plant stem diameter, and 55.68% in leaf area relative to control (T1). It is concluded that humic and fulvic acids increase the dry weight, length and leaf area of *P. ligularis*.

Keywords: Humic and fulvic acids, *Passiflora ligularis*, growth

INTRODUCCIÓN

Los ácidos húmicos son moléculas complejas formadas por la descomposición de materia orgánica, influyen en la fertilidad del suelo por su efecto en el aumento de su capacidad de retener agua y contribuyen significativamente a la estabilidad y fertilidad del suelo resultando en crecimiento excepcional de la planta y en el incremento en la absorción de nutrientes¹. Hay evidencia también que parte de las materias húmicas contienen poblaciones grandes de actinomicetos que pueden degradar una amplia gama de sustancias inclusive de celulosas, hemicelulosa, proteínas, y ligninas. Estos ácidos tienen la propiedad de formar compuestos de muy bajo peso molecular con iones de carga positiva, un proceso conocido como quelación, cuyos compuestos asociados a minerales son altamente absorbibles por las plantas y les permite almacenar tanto vitaminas como minerales^{2,3}.

Originarias de América del Sur, las especies de *Passiflora* se hallan distribuidas en México, Antillas, Centro y Sudamérica, teniendo como localidad tipo al Perú, entre los 900 y 2700 msnm; están adaptadas al clima subtropical (temperaturas entre 14 °C y 24 °C) y requieren de suelos profundos y fértiles con buena aireación, textura franca o franco arenosa y suelo con gran contenido de materia orgánica⁴. Por ello, para obtener plantas de calidad es necesario una apropiada nutrición, control de las condiciones ambientales, y emplear un sustrato adecuado, libre de patógenos, rico en nutrimentos esenciales, pH adecuado, textura y estructura apropiada⁵.

Oxapampa, Jaén, Ayacucho, Huánuco, Huaral y Trujillo son las zonas de mayor producción de granadilla y aportan al mercado interno del Perú con cuatro mil TM/año, que es la producción nacional estimada, cifra modesta frente a la producida por los países vecinos Bolivia, Ecuador y Colombia, que aportan cifras dirigidas al mercado internacional⁶.

La fertilización de *P. lingularis*, cuyos frutos se consumen como fruta fresca y es fuente de carbohidratos, vitaminas, grasas y minerales⁷, tiene características diferentes a otras especies: desde la siembra es necesaria la incorporación de materia orgánica y los elementos NPK. Al segundo año el abonamiento puede ser fraccionado cada 90 días. Antes de la primera floración debe ser complementada con abonos foliares a base de Ca, B, Zn, Fe y posterior al cuajado de los frutos se puede complementar con insecticidas y fungicidas^{6,8,9}.

Los ácidos húmicos son absorbidos por raíces de trigo y aproximadamente un 5% es transportado hacia el tallo¹⁰; se sabe que la absorción de ácidos fúlvicos y ácidos húmicos se incrementan con el tiempo de incubación y que los ácidos húmicos de bajo peso molecular se absorben tanto en forma activa como pasiva, mientras los ácidos húmicos de peso molecular superior a 50.000 Dalton se absorben sólo de forma pasiva^{11,12,13}.

Al mismo tiempo, se ha verificado que la incorporación de humus a los terrenos de cultivo mejoran el crecimiento vegetal; así, se ha observado que las plántulas de *Plukenetia conophorum* cultivadas en un sustrato conformado por humus alcanzaron mayor tamaño que las plántulas control durante las primeras semanas después del trasplante^{14,15}.

Teniendo en cuenta que sus frutos contienen carbohidratos, vitamina C, minerales, fosforo y niacina, razón por la cual es propuesta por pediatras en la dieta de neonatos¹⁶, *P. ligularis* se convierte en una especie de interés regional cuya producción debe mejorarse a través de diversas investigaciones en campo, invernadero y laboratorio. En este contexto, se planteó evaluar el efecto biofertilizante de los ácidos húmico y fulvico en condiciones de invernadero sobre plantas de *P. lingularis*, esperándose un mayor desarrollo longitudinal y foliar, tal como ha sucedido con otras especies vegetales.

MATERIAL Y METODOS

Material Biológico:

El material vegetal estuvo constituido por plantas de *Passiflora ligularis* L. "granadilla", obtenidas de semillas provenientes del Proyecto CHAVIMOCHIC, Departamento de La Libertad. Las plantas fueron cultivadas en recipientes de tecnopor de 21 x 12 x 14 cm. conteniendo 2 kg de un sustrato obtenido al mezclar arena de río y musgo en una proporción 2:1. Las plantas fueron regadas con la solución nutritiva La Molina y mantenidas bajo condiciones de invernadero.

Tratamientos:

Cuando los hipocótilos de las plántulas alcanzaron una longitud de 10 cm fueron sometidos al azar a los siguientes tratamientos:

- **I:** Plantas regadas solo con solución nutritiva La Molina.
- **II:** Plantas regadas con solución nutritiva La Molina más 1% de ácido húmico y de ácido fúlvico (Humistar).
- **III:** Plantas regadas con solución nutritiva La Molina más 3% de ácido húmico y de ácido fúlvico (Humistar).

Obtención de datos:

- **Determinación de la longitud de tallo:** mediante el uso de una wincha starlet de tres metros, midiendo directamente el tallo, cada 15 días.
- **Determinación del peso fresco y peso seco de planta.** se pesaron las plantas en una balanza analítica fresco y después se colocaron en una estufa a 50° C por 3 días y se volvieron a pesar.
- **Determinación del diámetro de de tallo:** se utilizó un vernier digital, midiendo directamente el diámetro de tallo.
- **Determinación del área Foliar:** se hizo delimitando el contorno de las hojas sobre un papel de peso conocido y luego relacionando con el área (método de las siluetas), hasta los 90 días.

Análisis estadístico:

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente: Análisis de Varianza Simple para determinar la influencia de los ácidos húmico y fúlvico en el crecimiento, prueba de comparación de medias de Duncan para determinar el mejor tratamiento. Utilizando el programa SPSS Versión 15

RESULTADOS

El tratamiento de *P. ligularis* "granadilla" con ácidos húmico y fúlvico produjo una variación en el crecimiento de las plantas, respecto al peso fresco y seco de los tallos (Tablas 1 y 2), así como, aumento en la longitud de las plantas y variación en el diámetro y área foliar (Tablas 3, 4 y 5), con diferente significancia estadística ($p < 0,05$).

Tabla 1. Promedios del peso fresco de plantas de *Passiflora ligularis* L. "granadilla", tratadas con solución nutritiva La Molina –SNLM- (I), con SNLM más ácido húmico y fulvico al 1% (II) y SNLM más ácido húmico y fulvico al 3% (III)

BLOQUES			
I	II	III	\bar{x}
24.92	24.38	23.85	24.38
27.82	26.71	25.92	26.82
35.88	36.70	35.92	36.17

$P < 0,05$

Tabla 2. Promedios del peso seco de plantas de *Passiflora ligularis* L. "granadilla", tratadas con solución nutritiva La Molina –SNLM- (I), con SNLM más ácido húmico y fulvico al 1% (II) y SNLM más ácido húmico y fulvico al 3% (III)

Tratamientos	BLOQUES			\bar{x}
	I	II	III	
T1	5.26	4.90	5.31	5.16
T2	6.25	6.07	6.09	6.14
T3	7.92	8.07	8.35	8.11

P<0,05

Tabla 3. Promedios de longitud (cm) del tallo de *Passiflora ligularis* L. "granadilla", tratadas con solución nutritiva La Molina –SNLM- (I), con SNLM más ácido húmico y fulvico al 1% (II) y SNLM más ácido húmico y fulvico al 3% (III)

Tratamientos	BLOQUES			\bar{x}
	I	II	III	
T1	20.7	21.66	21.69	21.35
T2	22.86	23.11	23.90	23.29
T3	31.75	32.74	32.66	32.38

P<0,05

Tabla 4. Promedios de diámetro (cm) del tallo de *Passiflora ligularis* L. "granadilla", tratadas con solución nutritiva La Molina –SNLM- (I), con SNLM más ácido húmico y fulvico al 1% (II) y SNLM más ácido húmico y fulvico al 3% (III)

Tratamientos	BLOQUES			\bar{x}
	I	II	III	
T1	2.86	2.69	2.68	2.74
T2	3.76	3.70	3.79	3.75
T3	3.92	3.92	4.16	4.00

P<0,05

Tabla 5. Promedios de área foliar de *Passiflora ligularis* L. "granadilla", tratadas con solución nutritiva La Molina –SNLM- (I), con SNLM más ácido húmico y fulvico al 1% (II) y SNLM más ácido húmico y fulvico al 3% (III)

Tratamientos	BLOQUES			\bar{x}
	I	II	III	
T1	61.86	62.74	62.52	62.37
T2	66.29	67.26	67.26	68.48
T3	86.69	89.39	85.22	97.10

DISCUSIÓN

El crecimiento de las plantas de *Passiflora ligularis* L. "granadilla", analizados según la longitud de tallo, diámetro de tallo, peso fresco y seco de tallo, después de haber sido regadas con solución nutritiva la molina y ácidos húmico y fúlvico a diferentes concentraciones (tratamientos 1, 2 y 3), han influenciado en el crecimiento de las plantas de "granadilla". Esto era de esperarse ya que está plenamente establecido que dichas sustancias favorecen la degradación de sustancias orgánicas y la absorción por parte de la planta, hecho que se traduce en un mejor desarrollo^{1,2,17}.

En el tratamiento 3 se obtuvo mayor incremento del peso fresco de planta (36.17 g) y peso seco de planta (8.11g), equivalente a un incremento de 57.46 % y 48.35 % respectivamente respecto a los resultados del control (T1), estadísticamente demostrados que los ácidos húmico y fúlvico influenciaron en crecimiento de las plantas de "granadilla", según el ANAVA con una probabilidad de 0.05 y según la comparación de medias por el método Duncan, el tratamiento 3 es el mejor; Esto se debe que los ácidos húmicos mejoran la cantidad del suelo y los ácidos fúlvico mejoran la absorción de nutrientes por planta⁶. En consecuencia, las plantas disponen de una cantidad adecuada de nutrientes, lo cual le permite que la planta en su conjunto aumente la actividad de sus vías metabólicas, en especial la vía fotosintética, permitiendo formar una mayor cantidad de moléculas de glúcidos, de las cuales muchas servirán como moléculas precursoras para la formación de otras moléculas orgánicas, permitiendo un incremento de masa o peso seco de los tallos^{15,18}.

El hecho que los ácidos húmico y fúlvico han influenciado en el crecimiento de las plantas, al permitir que el tratamiento 3 alcance una mayor longitud de tallo (32.38 cm) y diámetro (4. cm) de los tallos de "granadilla", que significa un incremento de 51.66% y 45.98 % respectivamente, dicha influencia por los ácidos antes mencionados se confirmaron según los análisis estadísticos de ANAVA con una probabilidad de 0.05 y demostrado que el tratamiento 3 es el mejor en según comparación de promedios por el método Duncan, este incremento de longitud y diámetro de tallo, se debe a la formación de quelatos con los minerales del suelo por acción de los ácidos húmico y fúlvico, favoreciendo la absorción de los minerales por las plantas³, de esta manera se incorporan a los tejidos vegetales, en especial a los meristemos apicales, así mismo favorece un crecimiento en espesor de las plantas.

Los resultados del área foliar donde se observa que el tratamiento 3 presenta la mayor área foliar(97.10 cm²), respecto a los tratamientos (T1=62.37cm² y T2= 68.48cm²); resultado que evidencia la influencia de los ácidos húmico y fúlvico, corroborado por el análisis estadístico ANAVA con una probabilidad de 0.05, además en análisis de comparación de medias según Duncan indica que el mejor tratamiento fueron las plantas que se regaron con 3% de ácido húmico y fúlvico (T3); Este incremento del 55.68% del área foliar respecto al control (T1), probablemente se debe a la influencia de los ácidos húmico y fúlvico, por permitir una mejor absorción de los minerales por las plantas y facilitar el transporte de nutrientes de la planta^{3,17}. Esto desencadena un mejor crecimiento de la planta, al favorecer la relación C/N entre 9 y 10 veces⁹. Y siendo el nitrógeno un elemento clave para el crecimiento de las plantas, este elemento influye en forma directa en la producción vegetal, es empleado principalmente en la síntesis de proteínas, clorofila, ácidos nucleicos y otros compuestos orgánicos^{10,11}. Favorece el aumento del área foliar, con el consiguiente aumento de la tasa fotosintética de la planta, y el mantenimiento del crecimiento vegetativo de los tejidos^{6,7,11,15}. Así mismo se observa que las plantas que fueron regadas con ácidos húmico y fúlvico presenta una coloración verde oscura respecto al control, donde además se aprecia clorosis incipiente. En suma, si se tiene en cuenta que *P. ligularis* está formalmente registrada en el Perú y otras partes de Sudamérica^{7,19} y que sirve de nutrientes a los neonatos, ancianos y personas con problemas de colesterol alto, deben seguir investigándose los modos cómo mejorar la producción; un de ellas, como aquí se verificó es multiplicar la producción de plantones en invernadero utilizando en su crecimiento los ácidos humnico y fulvico.

CONCLUSIONES

- Las concentraciones de 3% de ácido húmico y fúlvico (T3), influenció más en el crecimiento de *Passiflora ligularis* L. “granadilla” permitiendo un incremento 57.46 % del peso fresco y 48.35 % del peso seco de planta.
- El T3 permitió un incremento del 51.66% % en longitud de tallo y 45.98 % en diámetro de tallo en plantas y 55.68% del área foliar de *Passiflora ligularis* L. “granadilla”.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ayhan D. Characterization of humic substance from lignite samples. *Energy sources* 2003; 25:23-22
2. Bodwell C, Hopkins D. Nutritional characteristics of oilseed proteins. In: AM Altschul & HL Wilcke (eds.), *New Protein Foods*. Vol.5, Seed Storage Proteins. Orlando, USA: Academic Press 1985; pp.221-257
3. Hirzel C. Manejo y corrección de la fertilidad física y química del suelo a través del uso de enmiendas orgánicas. INIA. Quilamapu, Chillan. Chile. 2005.
4. Benalcázar A. Seminario de Agro Negocios. Extracto y fresco. 2001.
5. Peixoto J. Efeito da materia orgânica, do superfosfato simples e do cloreto de potasio na formação de mudas de maracuja zeiroazedo (*Passiflora edulis flavicarpa* DEGENER). Tese Mestrado. Escola Superior de Agricultura Lavras, Lavras. Brasil. 1986.
6. Herrera M. Jornada de capacitación UNALM-Agrobanco, Oxapampa. Perú. 2001.
7. Sánchez I, Ángel F. Passifloras de los Andes. En: JG Cruz & PA Torres (eds.). *Frutales para México*. Contribuciones del Caribe y Sudamérica. UAM, México. 2002.
8. Delanoy M, Van P, Scheldeman X, Beltran J. Germination of *Passiflora mollissima* (Kunth), *Passiflora tricuspidis* Mast. and *Passiflora nov.* sp. seeds. *Sci Hort* 2006; 110: 198-203.
9. Julca O, Meneses M, Blas R, Bello S. Materia Orgánica, importancia y experiencias de su uso en la agricultura. *IDESIA* 2006; 24(1): 49-61.
10. Vaughan D, McDonald I. Some effects of humic acid on the cation uptake by parenchyma tissue. *Soil Biol. Biochem* 1976; 8: 415-421.
11. Vaughan D, Ord B. Uptake and incorporation of ¹⁴C-labelled soil organic matter by roots of *Pisum sativum* L. *J Exp Bot* 1981; 32: 679-687.
12. Vaughan D, Malcolm R, Ord B. Influence of humic substances on biochemical processes in plants. In: D Vaughan & RE Malcolm (eds.), *Soil organic matter and biological activity*. Dordrecht. Alemania: Martinu Nijhoff/Dr. W. Junk Publ. 1982; pp.77-108.
13. Führ F, Sauerbeck D. The uptake of colloidal organic substances by plant roots as shown by experiments with ¹⁴C-labelled humus compounds. In: Report FAO/IAEA Meeting, Viena. Oxford, USA: Pergamon Press, Oxford 1967; pp.73-82
14. Egharevba R, Ikhatua M, Kalu C. The Influence of seed treatments and growing media on seedling growth and development of African walnut, *Plukenetia conophorum*. *African J Biotechnol* 2005; 4 (8): 808-811.
15. Taiz L, Zeiger E. *Plant Physiology*. USA: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 2006.
16. Nabors M. *Introducción a la Botánica*. España: Pearson Educación, SA. 2006.
17. Ministerio de Medio Ambiente (MMA). *Ácidos húmicos y fúlvicos para hidrosiembras*. España. 2008.
18. Poza M. Utilización de resinas cationicas en el estudio de sustancias húmicas. *Estación experimental de aula Dei* 1975; 13(1/2):179-187
19. Hernández A, Bernal R. *Lista de especies de Passifloraceae de Colombia*. Universidad de Antioquía. Colombia. 2000.



Contenido de prolina en *Solanum lycopersicum* pretratado con glicina betaina y sometido a estrés salino

Proline content in *Solanum lycopersicum* pretreated with glycine betaine under salt stress

Mercedes Chaman Medina, Roger Veneros Terrones, Edita Araujo Castillo, Aureliano Ramírez Cruz, Jose Hidalgo Rodríguez, Bernabé S. Luis Alaya y Cynthia Ramos Otiniano

Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

RESUMEN

Las plantas han desarrollado varios mecanismos protectores para contrarrestar el estrés salino, uno de ellos es la acumulación de solutos compatibles como prolina y glicina betaina. Sin embargo, algunos cultivos como el tomate no acumulan glicina betaina, ante esto surge la alternativa de la aplicación exógena de estos compuestos. En este trabajo, se propuso evaluar el contenido de prolina en relación al estado hídrico en plántulas de *Solanum lycopersicum* var. Río Grande "tomate" pretratado con diferentes concentraciones de glicina betaina y cultivadas en diferentes niveles de salinidad. Plántulas fueron tratadas con glicina betaina a concentraciones de 0, 1 y 10 mM, y luego sometidas a cloruro de sodio: 0, 100 y 200 mM agregada esta sal a la solución de riego. Después de 10 días de tratamiento se cuantificó prolina y contenido relativo de agua. El contenido de prolina aumentó con el grado de salinidad y la aplicación de Glicina betaina 1 mM produjo un aumento significativo en NaCl 100mM.

Palabras clave: prolina, glicina betaina, estrés salino, *Solanum*.

ABSTRACT

Plants have developed various protective mechanisms to counteract the salt stress; one of them is accumulation of compatible solutes such as proline and glycine betaine. However, some crops such as tomato not accumulate glycine betaine, this alternative to the exogenous application of these compounds arises. In this paper, we proposed evaluate content of proline in relation to water status in seedlings of *Solanum lycopersicum* var. Río Grande "tomato" pretreated with different concentrations glycine betaine and grown under different levels salinity. Seedlings were treated with glycine betaine concentrations 0, 1 and 10 mM, and then subjected to sodium chloride: 0, 100 and 200 mM this salt added to the irrigation solution. After 10 days treatment was quantitated proline and relative water content. Proline content increased with the degree salinity and application of 1 mM glycine betaine was significant increase in 100 mM NaCl.

Keywords: proline, glycine betaine, salt stress, *Solanum*.

INTRODUCCIÓN

Las plantas exhiben una respuesta dual frente al estrés salino que implica una respuesta temprana y otra tardía; la primera, está relacionada al estrés osmótico resultado del potencial hídrico negativo del suelo salino y la segunda, a la acumulación de Na^+ en tejidos foliares¹. Solamente plantas con mecanismos adaptativos pueden evitar el efecto adverso de la salinidad². El ajustamiento osmótico a nivel fisiológico, es un mecanismo adaptativo involucrado en la tolerancia a la sequía o salinidad, el cual permite mantener la turgencia celular bajo condiciones de déficit hídrico y contrarrestar los efectos de una rápida disminución en el potencial hídrico foliar³. Esto último ocurre por la acumulación de altas concentraciones de iones inorgánicos o solutos orgánicos de bajo peso molecular. Si bien ellos juegan un rol crucial en el crecimiento de plantas superiores bajo condiciones salinas, su contribución varía entre especie, cultivares y entre diferentes compartimentos dentro de una misma planta.

En el tiempo, las plantas han desarrollado varios mecanismos protectores para contrarrestar el estrés abiótico tal como el frío, sequía y salinidad. Uno de los mecanismos es la acumulación de solutos compatibles⁴. Estos solutos son pequeños metabolitos orgánicos solubles en agua, no tóxicos a altas concentraciones que permiten a las células retener agua para evitar disturbios y permitir funciones normales cuando son expuestas a estrés abiótico⁵. Se incluyen entre los solutos compatibles a polioles, azúcares, aminoácidos y betainas, los cuales difieren entre especies⁶.

Hay evidencia que glicina betaina y prolina juegan un rol adaptativo en mediar el ajuste osmótico y proteger las estructuras subcelulares en plantas estresadas, estabilizando reacciones fotosintéticas, la estructura de proteínas extrínsecas del complejo fotosintético II, y síntesis de ATP y activación de enzimas^{6,7,8,9}.

La glicina betaina es la mejor betaina conocida, molécula bipolar pero eléctricamente neutra a pH fisiológico⁶, es un aminoácido derivado, soluble en agua, no tóxico, incoloro, naturalmente sintetizado en varias especies vegetales; sin embargo, muchas especies cultivadas importantes tipo papa o tomate son incapaces de acumularlo⁹. Es sintetizada a tasas elevadas en plantas bajo estrés abiótico^{10,11}. Los niveles de acumulación de GB son correlacionados con el aumento de la tolerancia por las plantas⁶. Muchas investigaciones revelan también que la acumulación de prolina contribuye al ajuste osmótico y tolerancia de las plantas expuestas a condiciones ambientales desfavorables. Por lo que se ha considerado como una respuesta universal de las plantas bajo estrés. La acumulación de prolina por deshidratación debido a un déficit hídrico o por aumento de la presión osmótica es la evidencia del rol que juega la prolina en la osmorregulación en plantas sometidas a los factores ambientales que producen el estrés hídrico.

En diversas especies la síntesis de glicina betaina es promovida por estrés por sequía y sal¹² como un soluto compatible que regula el balance osmótico intracelular; pero también ha sido demostrado su rol para estabilizar proteínas extrínsecas¹³, mantener la estructura de la membrana¹⁴, proteger el fotosistema II y síntesis de ATP contra los efectos inhibitorios del NaCl ¹⁵. Se ha encontrado, por ejemplo, que glicina betaina se acumula bajo estrés salino en trigo¹⁶ y en varias especies de Caryophyllaceae, Convolvulaceae, Compositae y Solanaceae¹⁷.

El tomate es una de las hortalizas más importantes y de amplia distribución en el mundo¹⁸; sin embargo, la salinidad puede reducir el rendimiento en las cosechas¹⁹, pero también se reporta que la salinidad mejora la calidad de los frutos al aumentar los sólidos solubles totales, contenido de ácido, y color²⁰. Se ha observado que muchas plantas cultivadas como las de tomate naturalmente no acumulan glicina betaina¹². Ante este hecho, la aplicación exógena de soluciones compatibles ha sido sugerida como un enfoque adicional, alternativo a la ingeniería genética para mejorar la productividad de los cultivos bajo condiciones de estrés²¹.

La aplicación exógena de glicina betaina aumenta en el vegetal su tolerancia a estrés por sequía y salino, puede mejorar el crecimiento y supervivencia de numerosas especies bajo condiciones de estrés y estabiliza, efectivamente, la estructura cuaternaria de enzimas, proteínas y mantiene un estado altamente ordenado de las membranas cuando concentraciones de sal o temperatura son extremas^{10,22,23,24}.

Las plantas de tomate no son capaces de sintetizar glicina betaina, pero son capaces de tomarlo cuando es aplicado exógenamente a las hojas²⁵. Ellas han sido consideradas que pueden servir de un buen sistema modelo para investigar el uso de la aplicación exógena cuando las plantas crecen en estrés ambiental. Estudios preliminares han mostrado, que la adición exógena de solución compatible a raíces de plantas jóvenes de tomate indujo tolerancia a las condiciones de estrés; sin embargo, en plantas maduras de tomate sensitiva a sales se ha reportado que ni prolina ni glicina betaina son capaces de contrarrestar los efectos del estrés salino²⁶. Este comportamiento nos lleva a considerar que la edad de la planta a la cual es expuesta a glicina betaina exógena juega un rol crítico en su respuesta al estrés salino.

En este trabajo se propone evaluar el contenido de prolina en relación al estado hídrico (contenido relativo de agua) en plántulas de *Solanum lycopersicum* var. Río Grande “tomate” pretratado con diferentes concentraciones de glicina betaina y cultivadas en diferentes niveles de salinidad, conseguida por concentraciones crecientes de NaCl.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de cultivo.

En este trabajo se utilizó plantas de *S. lycopersicum* Var. Río Grande, obtenidas a partir de semilla botánica certificada expendida comercialmente. Las semillas se colocaron a germinar en bandejas de polietileno sobre papel toalla humedecido con agua destilada y cubiertas con una película de plástico para mantener la humedad. Los sistemas de germinación fueron colocados en oscuridad hasta que los tallos de las plántulas alcanzaron un tamaño de 2 – 2.5 cm de longitud. Este material fue trasplantado y mantenido en recipientes de polietileno de 350 ml de capacidad, conteniendo solución nutritiva La Molina hasta que se estableció el primer par de hojas verdaderas, luego se traspasaron a recipientes de 1000 ml. Las plántulas crecieron en condiciones de invernadero a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta que tuvieron 4 semanas de edad, tiempo por el cual fueron mantenidas en solución nutritiva adecuadamente aireada.

Aplicación de glicina betaina y NaCl.

La aplicación de glicina betaina se realizó en dos etapas, cuando las semillas fueron embebidas y cuando las plántulas provenientes de estas semillas desarrollaron el primer par de hojas verdaderas. En ambos casos, se aplicó glicina betaina a las concentraciones de 0, 1.0, 10 mM; luego de dos horas del pretratamiento con glicina betaina fueron expuestas a NaCl a las concentraciones de 0, 100 y 200mM por 10 días.

Tanto para semillas como plántulas, éstas se distribuyeron en 3 grupos, cada uno conformado por 30 individuos, luego, completamente al azar se procedió a la aplicación de glicina betaina por aspersión y agregando Na Cl a la solución nutritiva. Se consideró tres replicas para cada tratamiento.

Cuantificación de prolina.

Para cuantificar prolina se utilizó el método descrito por Bates y cols.²⁷, se utilizó 0,5 g de tejido foliar o de raíz. Cada muestra fue congelada en nitrógeno líquido y homogenizada con ácido sulfosalicílico al 3%. El residuo fue removido por centrifugación a 13000 g por 10 min. Luego, 500 μl del extracto se hizo reaccionar con 500 μl de ácido acético glacial y 500 μl de ninhidrina ácida a 100°C por una hora. La reacción fue detenida en baño con hielo. El cromóforo conteniendo la prolina fue extraído con 1 ml de tolueno. La prolina fue cuantificada en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452, a 520 nm, usando L-prolina en la elaboración de la curva de calibración. La cantidad de prolina fue expresada en microgramos por gramo de peso fresco. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento.

Determinación del contenido relativo de agua (CRA).

Para determinar el CRA, se utilizó la primera hoja completamente expandida a partir del ápice de la planta, después de los respectivos tratamientos con glicina betaina y NaCl. Se registró el peso fresco (PF) de las hojas tan luego fueron retiradas de la planta. Luego se determinó el peso túrgido (PT), para lo cual, las hojas fueron colocadas en agua desionizada por 24 horas, después de este tiempo, las hojas fueron sacadas del agua, secadas sobre papel de filtro y pesadas. Finalmente, las hojas fueron secadas a 80°C hasta obtener un peso constante y se registró el peso seco (PS). El contenido relativo de agua se determinó mediante la fórmula: $\text{CRA} = (\text{PF} - \text{PS}) / (\text{PT} - \text{PS}) \times 100$. Se consideró tres repeticiones por tratamiento.

Evaluación y análisis estadístico de datos.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias según la prueba de significación de Duncan con un nivel de confianza de 95%. Se usó el paquete estadístico Statgraphics plus 5.1.

RESULTADOS

Las plántulas de *S. lycopersicum* Var. Río Grande, tratadas con glicina betaina y cultivadas en soluciones con diferentes concentraciones de NaCl, mostraron cambios en el contenido prolina y el contenido relativo de agua.

El contenido de prolina en plántulas tratadas con glicina betaina 0 mM y cultivadas con 100 y 200 mM de NaCl mostraron un aumento significativo con respecto al control (0 mM de NaCl), alcanzando los valores más altos a 200 mM, aumentando hasta 2.4 veces con respecto a las plántulas control (Fig. 1). Al comparar el contenido de prolina en plantulas tratadas con 0, 1 y 10 mM de glicina betaina y cultivadas con 0 y 200 mM de NaCl no mostraron diferencias significativas; sin embargo, se observó diferencias significativas cuando las plántulas crecieron en NaCl 100 mM y fueron tratadas con glicina betaina 10mM.

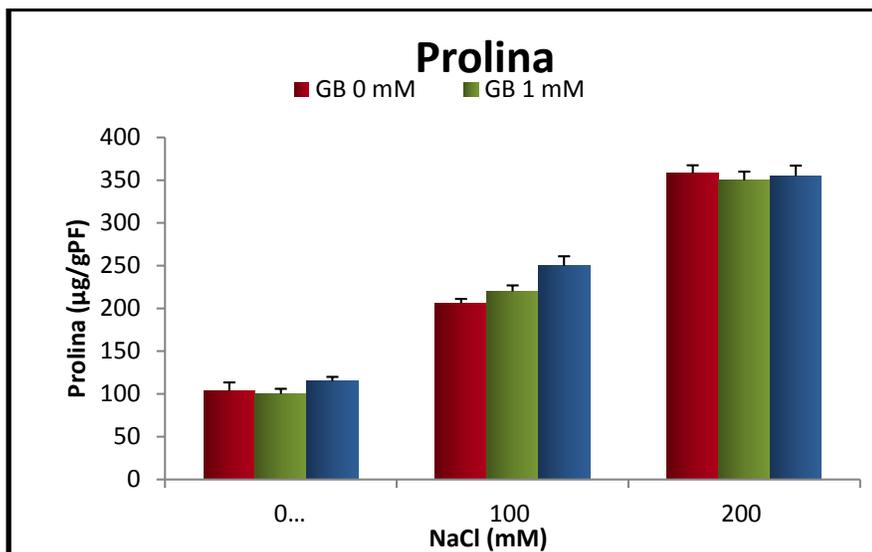


Fig. 1. Contenido de prolina en hojas de *Solanum lycopersicum* L. var. Río Grande, tratada con diferentes concentraciones de glicina betaina y cultivada en concentraciones crecientes de NaCl por 10 días. Las barras verticales representan el error estándar (n = 3).

El contenido relativo de agua (CRA) disminuyó significativamente en *S. lycopersicum* var. Río Grande después de ser expuestas a diferentes concentraciones de NaCl (Fig. 2). Mostro los valores más bajos a 200 mM de NaCl y 0 mM de glicina betaina (74 %); al comparar los promedios de las plántulas tratadas con 0, 1 y 10 mM de glicina betaina en las plántulas cultivadas con 0, 200 mM de NaCl no se encontró diferencias significativas en el CRA. En las plántulas cultivadas con 100 y 200 mM de NaCl se observo un aumento en el CRA, mas solo este aumento fue significativo entre los tratamientos 0 y 1 mM de glicina betaina en aquellas que crecieron en una concentración de 100 mM de NaCl.

DISCUSIÓN

En diversos trabajos se ha reportado la acumulación de prolina en tejidos, órganos de las plantas sometidas a varios tipos de estrés, entre ellos al estrés salino y que el aumento temporal de estos compuestos es importante en la respuesta de la planta al estrés. Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran aumento significativo en el contenido de prolina en hojas de *Solanum lycopersicum* L. var. Río Grande tratado con diferentes concentraciones de NaCl. Estos resultados concuerdan con los encontrados en tejido foliar de tres especies de tomate, *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum* y *Solanum pennell*²⁸; así también con los resultados observados en hojas y tallos de dos cultivares de tomates, cultivados *in vitro* con la adición de NaCl a una concentración de 160 Mm²⁹. La disminución de la turgencia es el disparador de la acumulación de prolina en plantas sujetas a condiciones de sequía ya que la pérdida de turgencia activa una compleja secuencia de eventos adaptativos correlacionados al nivel de estrés.

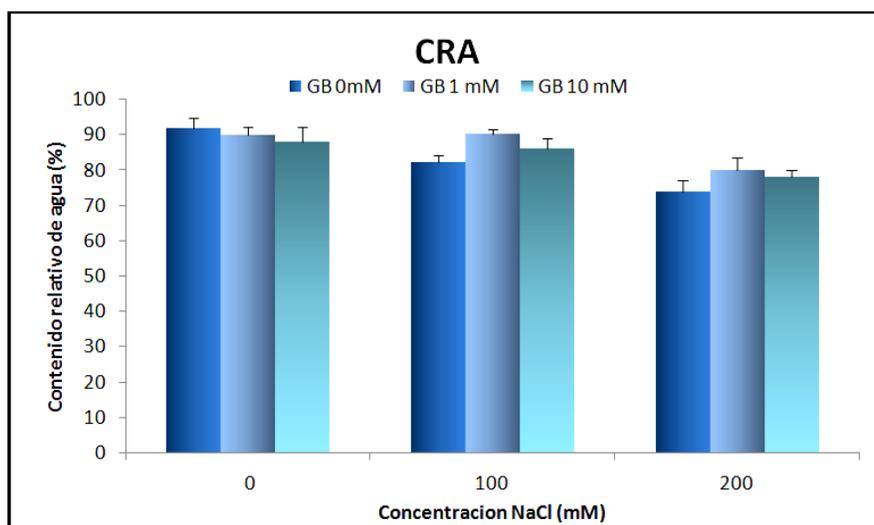


Fig 2. Contenido relativo de agua (CRA) en hojas de *Solanum lycopersicum* L. var. Río Grande, tratada con diferentes concentraciones de glicina betaina y cultivada en concentraciones crecientes de NaCl por 10 días. Las barras verticales representan el error estándar (n = 3).

La aplicación exógena de glicina betaina en plantas estresadas por sales ha sido descrita hace varias décadas y su función ha sido relativamente bien caracterizada³⁰. Cuando glicina betaina es aplicada exógenamente, ésta penetra en los tejidos foliares pronto, después de la aplicación y es rápidamente trasladada a las raíces, meristemos y hojas es expansión²⁵. Estos investigadores también han demostrado que glicina betaina queda sin metabolizar en los tejidos de la planta por varias semanas. Este comportamiento de glicina betaina estaría justificando el aumento del contenido de prolina en las plántulas de tomate tratadas con este metabolito, ya que además se menciona que una vez que la glicina betaina es trasladada a los órganos de la planta, actúa como un osmoprotector en las células³¹. Si bien las plantas de tomate no acumulan normalmente glicina betaina¹², se ha demostrado que glicina betaina es tomada rápidamente cuando es aplicada foliarmente y acumulada en sus hojas a varios niveles dependiendo de la concentración aplicada³².

El aumento de sales en la solución del suelo ocasiona disminución de los potenciales hídrico y osmótico, lo cual se refleja en el estado hídrico de la planta; es decir, la planta tiende a perder agua. Ante esta situación, la planta debe mantener un potencial hídrico más negativo que el sustrato para asegurar la absorción de agua y poder mantener una adecuada hidratación de sus tejidos³³.

En el presente trabajo se observó disminución del contenido relativo de agua (CRA) en *Solanum lycopersicum* var. Río Grande cuando fue expuesta a diferentes concentraciones de NaCl. Este comportamiento en el contenido relativo de agua estaría relacionado con la capacidad de respuesta de las especies al aumento de sales en el sustrato, es decir a su capacidad para generar potenciales hídricos que le permitan mantener la turgencia celular. En las plantas expuestas a concentraciones elevadas de sales, deben ocurrir cambios en el flujo de agua de tal manera que las células y los tejidos se adapten a esta situación. La absorción de agua se lleva a cabo gracias al mayor potencial osmótico de la raíz con respecto al suelo y que ocurre en cuanto las células dejan de estar turgentes³⁴. Estas condiciones posiblemente se generan en las plantas de tomate tras la síntesis y acumulación de solutos compatibles, ayudados también por la aplicación exógena de glicina betaina. Prolina y glicina betaina mejoran el estado hídrico de plantas estresadas. Tales efectos pueden ser debidos a la inhibición del eflujo de agua vía efecto de estos solutos sobre la estabilidad de la membrana y sobre la transpiración reducida vía efecto de la regulación estomática, además de que estos solutos pueden estar involucrados en la osmorregulación³⁵.

También podría estar participando en el mantenimiento del estado hídrico de las plantas la actividad de las acuaporinas, proteínas canales de membrana (PIP), que juegan un papel dinámico clave en el control del movimiento del agua en las células de la raíz, y las proteínas TIP a nivel del tonoplasto, responsables del control del agua transcelular, para restablecer y mantener la homeostasis celular de los cambios en el potencial osmótico celular ocasionado por las sales³⁶; donde la Glicina betaina aplicada exógenamente estaría contribuyendo a mantener un estado altamente ordenado de las membranas cuando concentraciones de sal o temperatura son extremas²⁴. La aplicación de prolina y glicina betaina reduce el daño de la membrana, mejora la toma de K⁺ y el crecimiento. Ambos solutos mejoran la desestabilización de proteínas y la protección de membranas¹⁴.

CONCLUSIONES

- El estrés salino generado por NaCl aumentó el contenido de prolina en plántulas de *S. lycopersicum* var. Río Grande.
- La aplicación de glicina betaina aumento el contenido de prolina en plantas de *S. lycopersicum* expuestas a NaCl 100 mM.
- El NaCl causa disminución en el contenido relativo de agua y aumento del contenido de prolina en hojas de *S. lycopersicum* var. Río Grande.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Munns RA. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: Some dogmas and hypothesis. *Plant Cell Environ* 1993; 16: 15-24.
2. Blumwald E, Gilad S, Aharon M, Apse P. Sodium transport in plant cells. *Biochim et Biophys Acta* 2000; 1465:140-15.
3. Morgan JM. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 1984; 35: 299-319.
4. Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 1995; 25: 1099-1111.
5. Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 1982; 25: 1214-1222.
6. Rhodes D, Hanson AD. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol & Plant Mol Biol* 1993; 44: 357-384.
7. Hayashi H, Chen THH, Murata N. Transformation with a gene for choline oxidase enhances the cold tolerance of Arabidopsis during germination and early growth. *Plant Cell Environ* 1998; 21: 232-239.
8. Heuer B. Osmoregulatory role of proline in water and saltstressed plants. In: Pessaraki M (ed.) *Handbook of plant and crop stress*. New York: Marcel Dekker 1994; pp.363-381.
9. Gorham J. Betaines in higher plants – biosynthesis and role in stress metabolism. In: Wallsgrove, R.M. (ed.), *Aminoacids and their Derivates in Higher Plants*. University Press, Cambridge 1995; pp.172-203.
10. Allard F, Houde M, Krol M, Ivanov A, et al. Betaine improves freezing tolerance in wheat. *Plant Cell Physiol* 1998; 39: 1194-1202.

11. Nomura M, Ishitani M, Takabe T, Rai AK, Takabe T. *Synechococcus* sp. PCC7942 transformed with *Escherichia coli* bet genes produces glycine betaine from choline and acquires resistance to salt stress. *Plant Physiol* 1995; 107: 703-708.
12. Wyn RG, Storey R. Betaines. In: Paleg, LG, Aspinall D. (eds.), *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. Academic Press, Sydney 1981; pp.172-205.
13. Papageorgiou GC, Fujimura N, Murata N. Protection of the oxygen-evolving photosystem II complex by glycinebetaine. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1057: 361-366.
14. Jolivet Y, Lahrer F, Hamelin J. Osmoregulation in higher plants: the protective effect of glycinebetaine against the heat destabilization of membranes. *Plant Sci Lett* 1982; 25: 193-201.
15. Murata N, Mohanty PS, Hayashi H, Papageorgiou GC. Glycinebetaine stabilizes the association of extrinsic proteins with the photosynthetic oxygen-evolving complex. *FEBS Lett* 1992; 296: 187-189.
16. Mamedov MD, Hayashi H, Wada H, Mohanty PS, Papageorgiou GC, Murata N. Glycinebetaine enhances and stabilizes the evolution of oxygen and the synthesis of ATP by cyanobacterial thylakoid membranes. *FEBS Lett* 1991; 294: 271-274.
17. Jokinen K, Somersalo S, Mäkelä P, Urbano P, et al. Glycinebetaine from sugar beet enhances the yield of field-grown tomatoes. *Acta Hort* 1999; 487: 233-236.
18. Maas EV. Salt tolerance of plants. *Appl Agric Res* 1986; 1: 12-26.
19. Tanwar BS. *Saline water management for irrigation*. International Commission on irrigation and drainage. New Delhi, India. 2003.
20. Zhao Y, Aspinall D, Paleg LG. Protection of membrane integrity in *Medicago sativa* L. by glycinebetaine against the effects of freezing. *J Plant Physiol* 1992; 140: 541-543.
21. Itai C, Paleg LG. Responses of water-stressed *Hordeum distichum* L. and *Cucumis sativus* to proline and betaine. *Plant Science Lett* 1982; 25: 329-335.
22. Mäkelä P, Jokinen K, Kontturi M, Peltonen-Sainio P, et al. Foliar application of glycinebetaine—a novel product from sugar beet—as an approach to increase tomato yield. *Industr Crops Prod* 1998; 7: 139-148.
23. Mäkelä P, Kontturi M, Pehu E, Somersalo S. Photosynthetic response of drought- and salt-stressed tomato and turnip rape plants to foliar applied glycinebetaine. *Physiol Plant* 1999; 105: 45-50.
24. Papageorgiou GC, Murata N. The unusually strong stabilizing effects of glycinebetaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynth Res* 1995; 44: 243-252.
25. Mäkelä P, Peltonen-Sainio P, Jokinen K, Pehu E, et al. Uptake and translocation of foliar-applied glycinebetaine in crop plants. *Plant Sci* 1996; 121: 221-230.
26. Heuer B. Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato plants. *Plant Sci* 2003; 165, 693-699.
27. Bates L, Waldren R, Teare Y. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and soil* 1973; 39: 205-207.
28. Chen WP, Li PH, Chen THH. Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. *Plant Cell Environ* 2000; 23: 609-618.
29. Amini F, Ehsanpour A. Soluble proteins, proline, carbohydrates and Na⁺/K⁺ changes in two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars under *in vitro* salt stress. *Am J Biochem & Biotech* 2005; 1: 212-216.
30. Hanson AD, Wyse R. Biosynthesis, translocation, and accumulation of betaine in sugarbeet and its progenitors in relation to salinity. *Plant Physiol* 1982; 70: 1191-1198.
31. Mc Cue KF, Hanson AD. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotech* 1990; 8: 358-362.
32. Park EJ, Jeknic Z, Chen THH. Exogenous Application of Glycinebetaine Increases Chilling Tolerance in Tomato Plants. *Plant Cell Physiol* 2006; 47: 706-714
33. Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, USA. 2000.
34. Rojas Garcidueñas, M. La resistencia a la sequía. *Ciencia UANL* 2003; 3: 326-331.
35. Delauney AJ, Verma DPS. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* 1993; 14: 215-223.
36. Bartels D, Ramanjulu S. Drought and salt tolerance in plants. *Plant Sci* 2005; 24: 23-58.



Efecto diurético de la ortiga, *Urtica dioica*, y los niveles de excreción de sodio en *Rattus rattus albinus*.

Diuretic effect of *Urtica dioica* and excretion levels of sodium in *Rattus rattus albinus*

Segundo F. Castillo Viera y Ericson F. Castillo Saavedra

Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo. Perú

RESUMEN

El propósito del presente estudio fue determinar si el extracto hidroalcohólico de *Urtica dioica* L. "ortiga" presenta efecto sobre la diuresis y los niveles de excreción de sodio en la orina de *Rattus rattus* var. *albinus*. Se utilizaron 30 especímenes, los mismos que se mantuvieron en ayunas 18 horas previas al inicio del experimento y durante las seis horas de recolección de la orina. Estos animales fueron divididos en tres grupos de tratamiento A, B y C, a los que se les administró, respectivamente, solución salina fisiológica, 10mg/Kg/pc de hidroclorotiazida y 1.5gr/Kg/pc de extracto hidroalcohólico de ortiga. Se encontró efecto diurético en el grupo C, al presentar un volumen urinario acumulativo de 11.82 mL, mayor significativamente ($p < 0.05$) respecto al grupo A (7.66 mL) y B (11.06 mL). Asimismo, referente a los niveles de excreción de sodio en la orina el grupo tratado con el extracto alcanzó un valor favorable estadísticamente significativa ($p < 0.05$) frente a los otros grupos. Se concluye que *U. dioica* presenta efecto diurético y aumenta los niveles de excreción de sodio en *Rattus r. albinus*.

Palabras clave: *Urtica dioica* L., efecto diurético, niveles de sodio, *Rattus rattus* var. *albinus*.

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine if the hydroalcoholic extract of *Urtica dioica* L. "nettle" has effect on diuresis and levels of sodium excretion in the urine of *Rattus rattus* var. *albinus*. Thirty-three specimens, the same that were fasted 18 before the start of the experiment and during the six-hour urine collection hours were used. These animals were divided into three treatment groups A, B and C, which were administered, respectively, physiological saline, hydrochlorothiazide 10mg/Kg/pc 1.5gr/Kg/pc, and hydroalcoholic extract of nettle. Diuretic effect was found in the C group, introducing a cumulative urinary volume of 11.82 mL, significantly higher ($p < 0.05$) compared to group A (7.66 mL) and B (11.06 mL). Also, on the levels of sodium excretion in the urine extract -treated group achieved a statistically significant positive value ($p < 0.05$) compared to other groups. It is concluded that *U. dioica* has diuretic effect and increases the levels of sodium excretion *Rattus r. albinus*.

Keywords: *Urtica dioica* L., diuretic, sodium levels, *Rattus rattus* var. *albinus*.

INTRODUCCIÓN

Los diuréticos incrementan la excreción renal de agua y sodio, aunque hablando en términos estrictos, diuresis sólo significa un aumento del volumen de orina. El efecto primario de la mayoría de fármacos diuréticos es reducir la reabsorción de sodio siendo un efecto secundario el aumento de la pérdida de agua. Todos los fármacos diuréticos que no son diuréticos osmóticos, actúan directamente sobre la célula del epitelio de los túbulos renales en regiones anatómicas determinadas de la nefrona; por lo general, esta acción se ejerce en lugares situados sobre la membrana de la luz del túbulo después de la filtración del fármaco en el glomérulo y de la secreción hacia el túbulo contorneado proximal^{1,2,3}. También existen los diuréticos de asa, los que actúan sobre el asa de Henle, y en particular sobre la rama ascendente gruesa del asa, donde se reabsorbe aproximadamente el 25% del sodio filtrado, son los más potentes de todos los agentes diuréticos y se denominan diuréticos de techo alto que permiten la excreción del 15 al 25% del sodio filtrado, en vez del 1% menos que se excreta normalmente en una dieta habitual^{4,5}.

El mecanismo de acción molecular de los diuréticos de basa es una acción inhibitoria sobre el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ en la membrana luminal de la rama ascendente gruesa del asa de henle. Los diuréticos del asa reducen la tonicidad del intersticio medular y por tanto inhiben la reabsorción del agua en el conducto colector. Esto da lugar a una abundante diuresis⁵.

La hidroclorotiazida es un diurético tiazidico que inhiben al cotransportador Na^+/Cl^- en el tubuli contorneado distal. En comparación de diuréticos de asa las tiazidas producen la diuresis moderada que excreta un máximo del 5% del sodio filtrado, siendo el 90% de este reabsorbido antes de llegar al túbulo contorneado distal. Por su acción diurética moderada es que se justifica como modelo terapéutico como patrón para evaluar la acción diurética, y compararlo con el efecto del extracto hidroalcohólico de *Urtica dioica* L. y poder demostrar si posee bondades diuréticas en *Rattus rattus* var. *albinus*^{4,5}.

En situaciones de enfermedades edematosas y también en alteraciones de la presión arterial se indica como una forma de terapia el uso de diuréticos para disminuir la volemia. En nuestro medio de acuerdo al nivel sociocultural y económico muchas veces no es posible el uso de medicamentos y existe un gran sector de nuestra comunidad que accede al uso de la llamada medicina tradicional, que se basa en el uso de plantas medicinales. Según estimaciones entre el 70 y 80% de población mundial recurre al uso de plantas medicinales para paliar sus enfermedades y conseguir la recuperación de su salud, lo que constituye el recurso más conocido y muchas veces el más accesible para la población³.

Urtica dioica L. contiene en la sumidad florida una gran variedad de fitoconstituyentes como: flavonoides (0.7-1.8%), rutina, isoquercitrina (0.02%), quercetina, kenferol, isoramnetina, astralgina; aceites esenciales: cetonas (38.5%) como 2-metil-hepten-2-en-6-ona, ésteres (14.7%), alcoholes libres (2%); ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico, ácidos clorogénico (clorofila a y b reconstituyente), cafeico, cafeilmálico; taninos; ácidos orgánicos: ácidos acético, butírico, cítrico, fórmico, fumárico; sales minerales (20%): hierro, azufre, ácido silícico (0.9-1.8%), sales potásicas (0.6%) y cálcicas, nitratos (1.5-3.0%); carotenos; esteroides: beta-sitosterol; aminas: hisyamina, serotonina, acetilcolina; alcaloides: betaína; vitaminas: vitamina A, B2, C, K1, ácido fólico y pantoténico^{6,7}. Se sabe que esta planta presenta actividad antioxidante, antimicrobiana, antiulcerosa, analgésica⁸, antiinflamatoria⁹, hipoglicémica^{9,10} y antihipercolesterolemia¹¹.

En medicina popular, se utilizan las hojas, tallos, y en menor medida el rizoma de ortiga, preparado como jugo fresco prensado, para su uso depurativo, diurético, astringente, hemostático, mineralizante y/o estimulante del sistema circulatorio, cuando hay dolores reumáticos, artritis, gota, neuralgias, hemorroides (pomada de ortiga), afecciones de la piel y del cuero cabelludo (caspa y caída del cabello), como drenador hepático y diurético de tipo volumétrico y eliminador de ácido úrico^{6,7}.

Tahri y cols.¹² investigaron la actividad diurética, natriurética e hipotensora de *U. dioica*, en base a los volúmenes de orina excretados a través de una perfusión continua intravenosa y demostraron que el extracto acuoso de las partes aéreas a una baja velocidad de 4 mg/Kg/h y una alta velocidad de 24 mg/Kg/h en *Rattus rattus* var. *albinus* presentaban actividad diurética, con posibles efectos tóxicos dosis dependiente. Mostacero y cols⁶, también le confieren actividad diurética a este vegetal. Por su parte, la

experiencia popular afirma que las hojas de la planta en estudio tienen acción diurética, aspecto que motivó a realizar el estudio experimental del efecto diurético y niveles de excreción de sodio del extracto hidroalcohólico de *Urtica dioica* en *Rattus rattus* var. *albinus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico:

Se trabajó con 30 ratas albinas, de ambos sexos, con una edad promedio de 3 a 4 meses, aparentemente sanas y un rango de peso corporal de 200 a 250 gramos y con plantas completas de ortiga recolectadas en diversas partes del departamento La Libertad (Perú), las que fueron identificadas taxonómicamente en el Herbarium Truxillense de la Universidad Nacional de Trujillo.

Cuantificación y dosificación del extracto hidroalcohólico de *Urtica dioica*.

Se pesó 100 g. de hojas de ortiga que se colocaron en una estufa a 35 °C, con la cantidad que se obtenga se procedió a molerla en un mortero. Dicho producto se hizo hervir con alcohol etílico al 70 % en un sistema de destilación. El producto que se obtuvo fue secado y mantenido en refrigeración^{12,13}. En base a un trabajo piloto se determinó la dosis efectiva cincuenta (DE₅₀) del extracto seco. El extracto hidroalcohólico seco diluido en agua destilada se administró a los animales de experimentación.

Preparación y distribución de los especímenes:

El total de animales fueron ubicados en una habitación cerrada libre de estímulos para su ambientación y recibieron dieta controlada por espacio de 15 días antes del experimento, en las siguientes condiciones: ciclo luz – oscuridad de 12 horas, temperatura, 22° a 26°C, seis animales en cada jaula.

Los especímenes fueron distribuidos en tres grupos, trabajados grupalmente en fechas diferentes:

- A. Grupo control: 10 especímenes.
- B. Grupo patrón: 10 especímenes.
- C. Grupo problema: 10 especímenes.

Estudio farmacodinámico:

La evaluación de la diuresis se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Lipschitz et al^{13,14,15}: se tomaron treinta ratas y se repartieron en tres grupos de diez animales cada uno. Los animales se mantuvieron sin comida y sin agua en las 18 horas previas al inicio del experimento y durante las seis horas de recolección de la orina.

Niveles de volumen urinario

A todos los animales se les administró por vía oral un volumen de agua de 25 ml por kg. de peso del animal.

- **Grupo control:** únicamente solución salina normal (sodio=154 mmol/L, cloro =154 mmol/L).
- **Grupo patrón:** hidroclorotiazida (10 mg/kg) disuelta en agua destilada.
- **Grupo problema:** (DE₅₀) de *U. dioica* a la dosis de 1.5 g/Kg de peso.

La orina se recolectó durante seis horas en jaulas metabólicas individuales a una temperatura ambiente de 22°C, midiéndose la orina excretada a intervalos de 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos y 360 minutos. La excreción urinaria, acción y actividad diurética se calcularon por medio de las siguientes fórmulas:

$$\text{Excreción urinaria} = \frac{\text{Orina producida}}{\text{Solución fisiológica administrada}} \times 100$$
$$\text{Acción diurética} = \frac{\text{Excreción urinaria grupo tratado}}{\text{Excreción urinaria grupo control}}$$
$$\text{Actividad diurética} = \frac{\text{Acción diurética extracto acuoso}}{\text{Acción diurética fármaco dependencia}}$$

Niveles de excreción de sodio

Los niveles de excreción de sodio fueron cuantificados en base a la orina recolectada después de la administración de las diferentes sustancias según grupo de tratamiento, luego de aplicar el test de Fantus^{9,10}.

Evaluación estadística, variables y escalas de medición:

Los datos recolectados fueron expresados en promedios, porcentajes y desviación estándar, los que se presentan en tablas simples y de doble entrada. El estudio comparativo de los resultados del tratamiento instaurado del grupo control, patrón y problema se resolvió mediante la prueba estadística *t* de student (*t*). Para inferir en base a los resultados se consideró que existe diferencia significativa si $p < 0.05$ ^{12,13,14}.

RESULTADOS

Al observar la distribución de los valores promedios acumulados de volumen urinario de los grupos de animales con el tratamiento instaurado (Tabla 1), se evidenció que al comparar el volumen urinario o denominado diuresis acumulativa a los 360 minutos o 6 horas postingesta, el grupo problema tiene la producción de orina con 11.82 mL y si se compara el grupo control frente al grupo patrón y grupo problema la diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Tabla 1: Valores promedios de volumen urinario a los 30, 60, 90 y 360 minutos post administración de solución salina fisiológica y el tratamiento instaurado.

Grupo de tratamiento	Diuresis		
	Acumulativa (mL)	Significancia p	
Control	7.66		
Patrón	11.06	< 0.05	^{1a}
Problema	11.82	< 0.05	^{1b} > 0.05 ^{1c}

1a: Comparación del grupo patrón y control

1b: Comparación del grupo problema y control

1c: Comparación del grupo problema y patrón

Se encontró que el pH se mantuvo sin variaciones significativas en todos los grupos de tratamiento, mientras que los niveles de excreción de NaCl en la orina de los grupos en estudio se apreció diferencia en contra del extracto de ortiga cuando se contrastó el grupo problema y el grupo control, y si se compara el valor de los niveles de cloruro de sodio en la orina expresado en gramos por litro de orina, (Tabla 2) se aprecia, asimismo, que el valor de la excreción de cloruro de sodio del grupo de ortiga es menor que el grupo de la hidroclorotiazida con diferencia significativa ($p < 0.05$). Este hallazgo nos invita a concluir en base a los propósitos de esta investigación experimental, que el extracto hidroalcohólico de *Urtica dioica* L. “ortiga” aumenta los niveles de producción de orina con aumento del volumen, sin cambios en los niveles de excreción de sodio.

Tabla 2: Valores promedios acumulados de la concentración de hidrogeniones (pH) y cantidad de NaCl en la orina post administración de solución salina fisiológica.

Grupo de tratamiento	Tiempo (minutos)	Niveles acumulativos NaCl (g/L)	Significancia p	
	Orina acumulada			
	pH			
Control	7	2.5		
Patrón	8	4.7	< 0.05 ^{1a}	
Problema	8	3.0	> 0.05 ^{1b}	< 0.05 ^{1c}

1a: Comparación del grupo patrón y control

1b: Comparación del grupo problema y control

1c: Comparación del grupo problema y patrón

El comportamiento del extracto hidroalcohólico de *U. dioica* sobre los niveles de excreción urinaria evidenciado en la tabla 01, la excreción urinaria representa el porcentaje (%) en orina del volumen de la ingesta previa durante la experiencia, es decir el grupo control elimina el 218.0% del volumen administrado, el grupo patrón elimina el 321.51% y el extracto de ortiga reporta un porcentaje de excreción urinaria con 337.7% (Tabla 3).

Tabla 3: Valores funcionales de excreción urinaria, acción diurética, actividad diurética y niveles de excreción de cloruro de sodio, según grupo de tratamiento.

Grupo de tratamiento	Excreción urinaria (%)	Acción diurética	Actividad diurética
Control	218.00		
Patrón	321.51	1.47	
Problema	337.71	1.54	1.04

Del mismo modo, en la Tabla 3 aparece el reporte de la acción diurética, es decir la comparación del grupo tratado con *U. dioica* y el grupo control, alcanzando un valor de 1.54 magnitud que indica que el extracto de ortiga, tiene mayor efectividad que el grupo control en la producción de orina, pero menor que el grupo patrón, porque éste alcanza un valor de 1.47 lo que indica que la hidroclorotiazida es mayor que el grupo control en la producción de orina. Asimismo sobre la diuresis, en la tabla aparece la actividad diurética de *U. dioica* comparado con el diurético conocido, como es la hidroclorotiazida, alcanza un valor de 1.04, lo que nos indica que el extracto en estudio tiene mayor actividad diurética que la hidroclorotiazida.

DISCUSIÓN

La nefrona es la unidad anatómica y fisiológica de la función renal, así cuando la sangre llega al glomérulo a través de la arteriola aferente lleva consigo todos los nutrientes absorbidos en el intestino y pasan a este nivel, para el proceso de filtración, la misma que se realiza a través de la cápsula Bowman del glomérulo y el riñón en su conjunto tiene la oportunidad de reabsorber las sales inorgánicas, agua, glucosa y otros nutrientes regulando los niveles homeostáticos de los iones y el agua en el organismo haciendo para ello una reabsorción selectiva. El túbulo proximal reabsorbe los 7/8 de agua y sodio del filtrado glomerular, a este nivel en la base del epitelio celular actúa la bomba de sodio que normalmente extrae el

sodio junto con los iones del cloruro de la célula hacia el capilar vecino y consecuentemente el gradiente eléctrico y la concentración desplaza el sodio y el agua de la luz del túbulo hacia el interior de la célula, la abundancia y el tamaño de las mitocondrias de la base del epitelio celular reflejan la energía gastada por la bomba de sodio⁴.

El estudio experimental del efecto diurético de *Urtica dioica* L. y los niveles de excreción de sodio en *Rattus rattus* var. *albinus* de acuerdo a los resultados del experimento, los valores centrales del volumen urinario acumulado, producido al cabo de los 360 minutos, están expuestos en la tabla 01, en la que aparecen los tres grupos de animales tratados, los mismos que fueron sometidos a una ingesta previa de 25 mL de agua por kg de peso corporal y luego cada grupo de trabajo se sometió a la ingesta de solución salina fisiológica; el grupo control recibió un volumen de 3.5 mL, el grupo patrón recibió 10 mg/Kg/pc de Hidroclorotiazida en un volumen de 3.40 mL y el grupo problema 1.5 gr/Kg/pc del extracto hidroalcohólico de *Urtica dioica* L. hasta alcanzar un volumen de 3.5 mL.

La administración de una carga hídrica uniformiza y mejora la respuesta de la sustancia probada. El exceso de agua y electrolitos simula una situación de edema, lo que justifica el empleo de este modelo experimental^{17,18}.

Los resultados obtenidos sobre volumen urinario acumulativo (diuresis acumulativa) según grupo de tratamiento confirmarían la hipótesis que el extracto de *Urtica dioica* L. se comporta mejor que el grupo control (7.66 mL) y grupo patrón (11.06 mL), ya que alcanza un volumen acumulativo urinario de 11.82 mL, infiriendo que el extracto hidroalcohólico de *Urtica dioica* L. tiene efectos similares o ligeramente mayor que la hidroclorotiazida, y dicho efecto posiblemente se deba al hecho de que hidroclorotiazida actúa inhibiendo el cotransportador de Na⁺/Cl⁻ en el túbulo contorneado distal de la nefrona. Sobre el particular expresa Page ⁴, los diuréticos tiazídicos producen una diuresis moderada que excretan como máximo el 5% del sodio filtrado, siendo el 90% de éste reabsorbido antes de llegar al túbulo contorneado distal; sin embargo pueden generar hiponatremia y alcalosis metabólica. La porción final del túbulo distal y túbulo colector son los principales sitios de secreción de potasio en el riñón y el transporte de Na⁺ y K⁺ a través de la membrana luminal tiene lugar a través de los canales iónicos en lugar de los transportadores⁴.

En base a los hallazgos similares a hidroclorotiazida reportados se postula que los principios activos que contiene el extracto hidroalcohólico de *Urtica dioica* L. bloquea los canales de sodio de la luz tubular y reducen la diferencia de potencial luminal y en consecuencia disminuye la fuerza impulsora de la secreción de potasio. El efecto neto de *Urtica dioica* L. sería reducir la reabsorción de sodio. El aumento del aporte de sodio al túbulo colector y siendo el sodio un soluto osmóticamente activo, al eliminarse por la nefrona, lleva consigo agua y por lo tanto aumenta la diuresis como en el presente estudio.

Si se comparan los resultados de este estudio con otras investigaciones que han evaluado este efecto a diferentes niveles de dosis, se puede apreciar que muy pocas veces se ha encontrado una correlación positiva entre la dosis y el efecto. En estudios realizados en extractos acuosos de *Bidens pilosa* L. y *Costus cylindricus* Jacq. el efecto no fue dosis dependiente, debido a que la excreción de orina de los grupos tratados a la dosis de 800 mg/kg fue más baja que cuando se trataron con la dosis de 400 mg/kg ¹⁸. En otros estudios se obtuvieron resultados similares al obtenido en el presente estudio, como los reportados por Maykel, Boffil, León y Daud que resultó ser dosis dependiente, acompañada de natriuresis significativas ^{17, 18, 19, 20}.

Los resultados obtenidos por *Urtica dioica* L. son inferiores al volumen excretado a las 6 h por otras plantas con acción diurética comprobada como: *Bodoa purpurascens* Cav. (58.2 ± 5.74 mL/kg), *Carica papaya* L. (54.08 ± 10.23 mL/kg), *B. pilosa* (50.22 ± 7.72 mL/kg), *Rhoeo spathacea* (Sw.) Stearn (47.98 ± 8.26 mL/kg), *C. cylindricus* Jack (52.89 ± 9.57 mL/kg) y *Capraria biflora* L. (42.71 ± 8.10 mL/kg) ¹⁷.

Existe correspondencia entre el volumen de orina y la concentración de Na⁺, este aspecto es coherente porque los mecanismos de acción de un gran número de fármacos diuréticos es decrecer la reabsorción de este ión, esto produce el arrastre del equivalente osmótico del agua, otra explicación que puede explicar este fenómeno, son las altas concentraciones de iones en las plantas medicinales. Todas las plantas producen altas concentraciones de K⁺ en la orina. Esto puede ser explicado si tenemos en cuenta los informes sobre varias especies vegetales que presentan potasio en su composición, por lo que a la cantidad de este ión excretada debido al efecto diurético de la planta, se sumaría el aportado por el propio vegetal^{18,19,20}.

CONCLUSIONES

- El extracto hidroalcohólico de *Urtica dioica* presenta efecto diurético en *Rattus rattus* var. *albinus*.
- El extracto hidroalcohólico de *U. dioica* aumenta los niveles de excreción de sodio en orina en *Rattus r. albinus*.
- El extracto hidroalcohólico de *U. dioica* aumenta la excreción urinaria, acción diurética y actividad diurética en *Rattus r. albinus*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berne R. Fisiología. 2da edición. Barcelona. Edit. Mosby/Doyma. 1998.
2. Eckert R. Fisiología animal. 3era ed. España: Edit. Interamericana McGraw Hill. 1990.
3. Fanci A, Harrison C. Principios de Medicina Interna. 14ava ed. Vol II. España: Me Graw-Hill-Interamericana S.A. 1998.
4. Page C. Farmacología integrada. España: Edit. Harcourt Brace. 1998.
5. Hardman J, Limbird L. Las bases Farmacológicas de la terapéutica. 9na ed. Mexico: Edit. Graw-Hill Interamericana Editores, S.A de CV. 1996.
6. Mostacero J, Castillo PF, Mejia CF, Gamarra TA, et al. Plantas Medicinales del Perú. Taxonomía, Ecogeografía, Fenología y Etnobotánica. Trujillo, Perú: Edit. Asamblea Nacional de Rectores, 2011.
7. Huerta J. Ortiga mayor *Urtica dioica* L. Medicina naturista 2007; 1(2): 131-137.
8. Gulcin I, Kufrevioglu O, Oktay M, Buyukokuroglu M. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). J Ethnopharmacol. 2004; 90: 205-215.
9. Morshed M, Alam J, Das M, Haque A, Ali L, Rokeya B. Antidiabetic and anti-inflammatory activity of *Urtica dioica* leaves on STZ induced type 1 diabetic model rats. Int J Pharm Sci Res 2011; 2: 1182-1187.
10. Qujeq D, Davary S, Moazzi Z, Mahjoub S. Effect of *Urtica dioica* leaf extract on activities of nucleoside diphosphate kinase and acetyl coenzyme, a carboxylase, in normal and hyperglycemic rats. Afr J Pharm Pharmacol 2011; 5: 792-796
11. Nassiri-Asl M, Zamansoltani F, Abbasi E, Daneshi M, Zangivand A. Effects of *Urtica dioica* extract on lipid profile in hypercholesterolemic rats. J Chin Integr Med 2009; 7: 428-433.
12. Tahri A, Yamani S, Legssyer A, Aziz M, et al. Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat. J Ethnopharmacol. 2000; 73: 95-100.
13. Méndez E. Determinación de la actividad diurética de la raíz de *Smilax domingensis* (zarzaparrilla), del fruto de *Averrhoa carambola* L (carambola dulce) y del fruto de *Capsicum annum* (chile pimienta) [Tesis de Químico Farmacéutico]. Universidad San Carlos de Guatemala. Guatemala. 2009.
14. Vásquez C. Validación farmacológica de la actividad diurética de hojas de Flor de Muerto (*Tagetes erecta* L.), hojas de Santo Domingo (*Baccharis trinervis* Lam.) y hojas de Matasano (*Casimiroa edulis* Llave. et Lex.) en infusión acuosa [Tesis de Químico Farmacéutico]. Universidad San Carlos de Guatemala. Guatemala. 2010.
15. Li P, Matsunaga K, Ohizumi Y. Enhancement of the nerve growth factor-mediated neurite outgrowth from pc12d cells by chinese and paraguayan medicinal plants. Biol Pharm Bull 1999; 22 7: 752- 755.
16. Matsunaga K, Sasaki S, Ohizumi Y. Excitatory and inhibitory effects of paraguayan medicinal plants *Equisetum giganteum*, *Acanthospermum australe*, *Allopylus edulis* and *Cordia salicifolia* on contraction of rabbit aorta and guinea-pig left atrium. Natural Med 1997; 51(5): 478-481
17. Maykel M. Actividad diurética de una decocción de *Costus pictus* D. Don. Rev Cubana Plant Med 2010; 15(2): 3-12
18. Boffil M. Diuretic Activity of five medicinal plants used popularly in Cuba. Pharmacology online. 2006 http://www.unisa.it/download/1966_145_226226808_40.Bofill.pdf
19. Leon MC, Tillán J. Diuretic effect and acute toxicity of *Orthosiphon aristatus* Blume (kidney tea). Rev Cubana Plant Med 1996; 1(3): 30-6.
20. Daud A, Habib M, Sánchez A. Actividad diurética de extractos acuosos de *Polylepis australis* Bitter (queñoa). Rev Cubana Plant Med 2007; 12(4): 23-28



Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad y estabilidad de pectinasas producidas por *Bacillus* spp.

Temperature and pH effect on the activity and stability of pectinase produced by *Bacillus* spp.

Julio C. Arellano Barragán, Steban A. Ilich Zerpa, Marco L. Salazar Castillo, Icela M. Rodríguez Haro, Willman N. Alarcón Gutiérrez y Fantasía O. Gasco Álvarez
Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

RESUMEN

Las pectinasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, como por ejemplo en productos de desecho, y su utilidad industrial es de gran importancia. En la presente investigación se trata de establecer algunos parámetros cinéticos a nivel de laboratorio para la producción de pectinasas por *Bacillus* spp. Se aisló y seleccionó cultivos puros de *Bacillus* spp. productores de la enzima a partir de muestras de tierra de cultivo de papa y naranja en medio agar nutritivo con sales y pectina como sustrato, se incubó y se realizó la lectura agregando alícuotas de una solución de lugol y aquellos cultivos que presentaban mayor halo de hidrólisis de pectina fueron seleccionados. Estos cultivos se sembraron en medio líquido nutritivo más sales y pectina y se incubaron por 24 – 48 horas; luego se centrifugaron y se obtuvo el sobrenadante denominado extracto crudo de pectinasa (ECP), el cual sirvió para realizar los ensayos de actividad y estabilidad del ECP a pHs y temperaturas variables. Se encontró que el pH y temperatura de máxima actividad del ECP está alrededor de 6,5 y 35°C, respectivamente. El ECP es estable a pH 6,5 y 8,5 a 35°C por 120 minutos, lo mismo es cierto a temperatura de 50°C hasta por 129 minutos y pierde su estabilidad a 70°C a los 120 minutos.

Palabras clave: *Bacillus*, pectinasas, pH, temperatura, actividad y estabilidad.

ABSTRACT

Pectinases are widely distributed in nature, such as waste products, and its industrial usefulness is of great importance. In the present investigation is to establish some kinetic parameters at the laboratory for the production of pectinase by *Bacillus* spp. Was isolated and selected pure cultures of *Bacillus* spp. producing enzyme from samples of farmland potato and orange in nutritive agar with salts and pectin as substrate, incubated and reading was performed by adding aliquots of a solution lugol and crops that had higher pectin hydrolysis halo were selected. These cultures were plated in more pectin salts and liquid nutritional medium and incubated for 24-48 hours; then centrifuged and the supernatant crude extract called pectinase (ECP), which was used for the tests of ECP activity and stability at pH and temperature variables was obtained. It was found that the pH and temperature of maximum activity of the ECP is about 6.5 and 35 °C, respectively. The ECP is stable at pH 6.5 and 8.5 at 35 °C for 120 minutes, the same is true for a temperature of 50 °C for 129 minutes to lose stability at 70 °C at 120 minutes.

Keywords: *Bacillus*, pectinase, pH, temperature, activity and stability.

INTRODUCCIÓN

Las pectinas son un grupo heterogéneo de polisacáridos complejos constituidos principalmente por cadenas largas de unidades de ácido D-galacturónico unidos entre sí por enlaces α -1-4, cadenas que forman el ácido poligalacturónico o ácido péctico^{1,2,3}. Estas unidades pueden estar parcialmente metiladas, esterificadas en el C-6 con alcohol metílico variable según el origen de la pectina. La pectina también contiene con frecuencia residuos de ramnosa, arabinosa y galactosa. Generalmente la ramnosa forma parte de la cadena principal, mientras que la arabinosa y la galactosa se encuentran en las cadenas laterales unidas a la cadena principal formando ramificaciones⁴.

Según el tratamiento que se haga a las materias primas (manzanas, frutas cítricas, piña, guayaba dulce, tomate de árbol, maracuyá y remolacha) se obtienen diferentes calidades de pectinas, de acuerdo con las necesidades de los productos terminados. Estas pectinas son, en la actualidad, ingredientes muy importantes en la industria de los alimentos, para hacer gelatinas, helados, salsas, queso^{1,5}.

La presencia de estas sustancias pécticas en el zumo de frutas, origina importantes problemas en su procesamiento industrial. Ello se debe a que, por su escasa solubilidad, retienen el jugo espesándolo y disminuyendo el rendimiento de la extracción y para su empleo en la extracción, clarificación y reducción de viscosidad en jugos de frutas, extracción de aceites de vegetales y cítricos, fermentación de café y té, entre otras numerosas aplicaciones industriales^{6,7,8}.

Las pectinasas actúan de manera sinérgica y secuencial y, además de encontrarse de manera natural en frutas y vegetales, también son producidas por microorganismos, tales como: bacterias, levaduras y hongos filamentosos³. Tanto la actividad enzimática como los mecanismos que controlan su síntesis y su secreción están bajo la influencia de diversos factores ambientales, tales como el pH del medio, la temperatura de incubación y la naturaleza y cantidad de la fuente de carbono⁴.

La inhibición y estabilidad enzimática son consideradas la mayor consternación en el desarrollo de procesos biotecnológicos; la estabilidad enzimática está influenciada por parámetros físicos (pH y temperatura) y parámetros químicos (inhibidores y activadores); asimismo, la hidrólisis enzimática de las sustancias pécticas también depende de varios factores fisicoquímicos, como por ejemplo, del tiempo de contacto, concentración de enzima, temperatura de incubación y pH. El efecto de la temperatura fue estudiado entre 0°C y 90°C así como el pH entre 4 y 11^{7,9,10}.

Se han desarrollado estudios sobre la producción de enzimas pécticas, utilizando la fermentación en medio sólido, sobre diferentes substratos: bagazo de caña de azúcar; salvado de trigo; sin embargo, pocos estudios han sido efectuados sobre la influencia de la composición del medio, en cultivo sobre soporte sólido. La composición del medio de cultivo es un factor importante en la inducción de pectinasas ya que influye sobre la diversidad y la cantidad de dichas enzimas pécticas^{11,12}.

Al mismo tiempo, existe una preocupación creciente por los efectos de la contaminación ambiental, por ello la presión pública ha influido tanto en la industria como en los gobiernos para su disminución. Las enzimas microbianas presentan aplicación industrial debido a su elevada eficiencia catalítica, su uso no daña el ambiente y su alta rentabilidad económica¹⁰.

Teniendo en cuenta que el Perú es un país que ha crecido considerablemente en la agroindustria, se considera conveniente desarrollar un proceso orientado al aprovechamiento integral de recursos provenientes este sector, además evitar la contaminación ambiental, por los residuos provenientes de estas actividades. Uno de estos residuos por aprovechar es el albedo de naranja que por su volumen resulta atractivo para la producción industrial de enzimas pécticas, por ello, se propuso una investigación orientada a determinar a algunos parámetros cinéticos a nivel de laboratorio, para la producción de pectinasas por *Bacillus* spp., específicamente, el efecto de la temperatura y pH sobre la actividad y estabilidad de la enzima, así como, seleccionar cultivos de *Bacillus* spp. productores de pectinasas y determinar el efecto del pH y temperatura óptimos que presentan la mayor actividad y estabilidad de la enzima en estudio. Se considera que a medida que se incrementa la temperatura y el pH, aumenta la actividad de la pectinasa hasta un punto donde ésta empieza a disminuir, del mismo modo, a medida que se incrementa la temperatura la estabilidad de la pectinasa disminuye en función del tiempo y del pH.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Pectinasas producidas por *Bacillus* spp. aislados a partir de muestras de suelo agrícola de papa y naranja.

Obtención, inactivación y extracción de pectinas cítricas

Se empleó el albedo (mesocarpio) del fruto de naranja, residuo sólido producido por la venta artesanal del jugo de naranja; en estado fresco o congelado el mismo día de su colección con el fin de evitar el crecimiento de bacterias u otras formas vivientes que descompongan el producto. Se cortó en trozos pequeños lo que constituye la materia prima para aislar pectinas¹³. La inactivación se hizo colocando la materia prima en estufa a 98°C por 10 minutos¹⁴. Posteriormente, 100g de materia prima inactivada fueron suspendidos en 600mL de agua destilada y a ésta se le agregó HCl 1N hasta obtener un pH entre 1.5 y 3. Luego se calentó a 70°C por 70 minutos¹⁵. A continuación, se filtró la suspensión anterior y el filtrado obtenido fue enfriado a temperatura ambiente (25°C) y luego se precipitó con etanol al 60% (v/v), con respecto al volumen de dicho filtrado^{14,15}. Finalmente, el proceso de secado del extracto crudo de pectina se realizó a 70°C en estufa y luego fue pulverizado^{14,15}.

Aislamiento de *Bacillus* spp. productores de pectinasas.

Se colectaron muestras de suelo con un peso aproximado de 100 g procedentes de cultivos de papa del distrito de Otuzco y de cultivos de naranja del distrito Virú, las que fueron colocadas en bolsas plásticas de poliestireno (de primer uso)¹⁶. Se trasladaron al laboratorio de Tecnología enzimática y Productos naturales, Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal – Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Nacional de Trujillo – Perú.

El aislamiento *Bacillus* spp productor de pectinasas se llevó a cabo en medio sólido Agar nutritivo. Para ello se realizó una suspensión de 1 g de tierra en 100 mL de agua destilada estéril (ADE), se agitó y se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻⁶ previo tratamiento térmico en baño maría a 85°C durante 10 minutos. Luego, se sembró en superficie (0,1mL de la dilución tratada). Se incubó a 28°C hasta 72 horas^{16,17,18}.

Las colonias con características morfológicas de *Bacillus* fueron repicadas en tubos con agar agar nutritivo¹⁹ y se incubaron durante 24 horas a 28°C para efectuar la prueba de la catalasa a fin de ubicarlas en el género *Bacillus*. Los aislamientos que resultasen positivos a la catalasa se conservaron en frascos de agar nutritivo inclinado a 4°C^{19,20}.

Medio para la producción de pectinasas

El medio conteniendo pectina como única fuente de carbono está caracterizado por (g/1000mL de agua destilada): pectina cítrica, 2; extracto de levadura, 1; agar, 15; KH₂PO₄, 0,2; CaCl₂, 0,05; (NH₄)₂SO₄, 1; MgSO₄·7H₂O, 0,8; MnSO₄, 0,05; pH = 6,8⁵. Se autoclavó a 15 lb/ 20 minutos. Se realizó control de esterilidad durante 24 horas².

Producción de Pectinasas

Se siguió el método de Fernandes-Salomao y col²¹, modificado por los autores; brevemente, en los medios anteriormente mencionados se sembraron por puntura los cultivos de *Bacillus* spp. aislados. Se incubó a 30°C por 18-24h. Luego se añadieron alícuotas de una solución de lugol y se observó la presencia o ausencia de halos de hidrólisis³. Se seleccionaron los cultivos que presentaron mayor halo de hidrólisis de la pectina es decir los cultivos que presentaron mayor relación diámetro de halo/ diámetro de colonia y mayor diámetro de colonia⁹.

Obtención de los extractos crudos enzimáticos

Se sembraron los cultivos seleccionados previamente (inóculo al 5%) en caldo YEPD modificado (g/100 mL buffer cítrico-citrato, pH 3,5): pectina, 2,0; Peptona de soja, 1,0; Peptona de carne, 1,0; Extracto de levadura, 1,0. Los cultivos se incubaron en agitación constante durante 24-48 horas a 30°C. Luego, se centrifugó a 5.000 rpm durante 15 min y el sobrenadante obtenido fue denominado extracto crudo de pectinasa (ECP)⁹.

Determinación de actividad enzimática en los ECP

Se determinó la actividad enzimática midiendo la cantidad de sustrato residual, para ello se utilizó 4,5 mL de solución de sustrato bufferado de pectina al 0,3% y 0,1 mL de ECP; se incubó a 31°C por 1 hora; luego se detuvo la reacción con 0,5 mL de solución de HCl 0,05N y 0,5 mL de solución Iodada. Se realizó la lectura después de 15 minutos de reposo a 530 nm de absorbancia en Spectronic 20. Una unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para variar 0,01 de absorbancia por minuto bajo las condiciones del ensayo, 31°C, pH 6,8^{9,11}.

Determinación del efecto del pH sobre la actividad del ECP

Se determinó el pH de máxima actividad del extracto crudo de la pectinasa realizando medidas de dicha actividad a diferentes pH (3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5 y 9,5) utilizando diferentes sistemas buffers de incubación^{9,22}.

Determinación de la estabilidad del ECP a diferentes pH en el tiempo

Para ello se colocaron alícuotas del ECP en tubos de ensayo y se sometieron a la acción de diferentes pH (4,5; 6,5 y 8,5) por 60 y 120 minutos. Luego se determinó la actividad residual del ECP^{9,22}.

Determinación del efecto de la temperatura sobre la actividad del ECP.

Se determinó la temperatura de máxima actividad realizando mediciones de la actividad del extracto crudo de la pectinasa a diferentes temperaturas: 25, 30, 35, 40, 45, 50 y 55 °C.⁹

Estabilidad del ECP a diferentes temperaturas en el tiempo

Para ello se colocaron alícuotas del ECP en tubos de ensayo y se incubaron a 50, 70 y 90 °C durante 60 y 120 minutos ⁹ y luego se determinó la actividad residual del ECP. Para garantizar los resultados y su reproducibilidad del presente trabajo, se realizaron cinco ensayos y cada uno por triplicado.

RESULTADOS

Se obtuvieron 15 cultivos primarios de *Bacillus* spp. aislados a partir de muestras de suelo de cultivos de papa (seis) y de naranja (nueve), los que presentaron halos de hidrólisis de pectina que van desde 2 mm hasta 17 mm de diámetro, siendo Bsn12, Bsn17, Bsn8 y Bsn7 los que presentaron mayor hidrólisis (17, 15, 13 y 12 mm) los cuales fueron seleccionados para realizar la selección secundaria en medio líquido (Tabla 1, Fig. 1).

Tabla 1. Selección primaria de cultivos de *Bacillus* spp. aislados a partir de muestras de suelo de cultivos de papa (Bsp) y de naranja (Bsn) con capacidad de hidrolizar la pectina (acción de pectinasa) expresado en milímetros (mm).

<i>Bacillus</i> aislado		Acción de pectinasa
N°	Código	Halo (mm)
1	Bsp1	4
2	Bsp2	7
3	Bsp3	2
4	Bsp4	4
5	Bsp5	8
6	Bsp6	2
7	Bsn7	12
8	Bsn8	13
9	Bsn9	10
10	Bsn10	5
11	Bsn11	2
12	Bsn12	17
13	Bsn13	2
14	Bsn14	14
15	Bsn15	15

La selección secundaria, en medio líquido, de los cultivos de *Bacillus* spp aislados y seleccionados por presentar mayor capacidad de hidrolizar la pectina en medio sólido, permitió determinar que el cultivo

Bsn15 presenta mayor hidrólisis de pectina (0,21 Absorbancia-Spectronic 20 a 530 nm); del sobrenadante “extracto crudo de pectinasa” de éste cultivo se realizaron los ensayos propuestos en este trabajo.

Se observó el efecto del pH sobre la actividad del extracto crudo de pectinasa de *Bacillus* spp aislado a partir de muestras de suelo de cultivos de naranja, notándose que describe un perfil clásico campaniforme con una máxima actividad entre los pH 6,5 y 8,5 decreciendo a medida que los pH son más distantes de estos valores (Fig. 2).

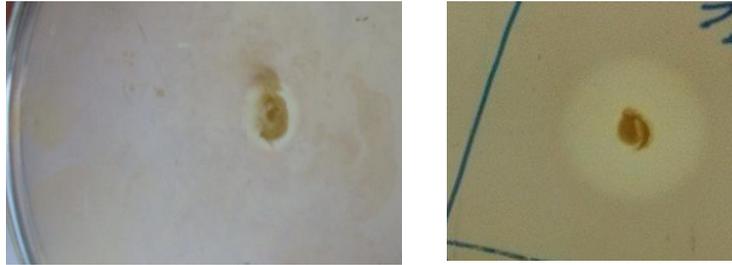


Fig. 1. Halos de hidrólisis de la pectina por cultivos de *Bacillus* spp. aislados a partir de muestras de suelo de tierra de cultivos de papa (izquierda) y naranja (derecha)

Tabla 2. Selección secundaria de cultivos de *Bacillus* spp. aislados a partir de muestras de suelo de cultivos de naranja con capacidad de hidrolizar la pectina (acción de pectinasa) expresado en unidades (cambio 0,01 de Absorbancia).

<i>Bacillus</i> aislado		Unidad de pectinasa / mL ECP
Nº	Código	Unidades (cambio 0,01 de Absorbancia)
1	Bsn7	20,0
2	Bsn8	20,8
3	Bsn12	26,6
4	Bsn15	36,6

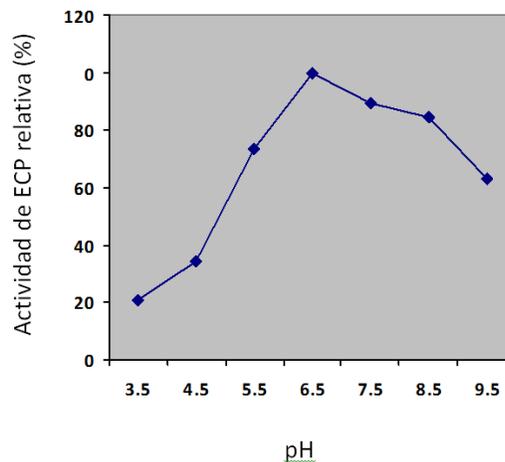


Fig. 2: Efecto del pH sobre la actividad del extracto crudo de pectinasa (ECP)

La estabilidad al pH del extracto crudo de la pectinasa de *Bacillus* spp aislado a partir de muestras de suelo de cultivos de papa y de naranja, donde se observa que el ECP es estable a pH 6,5 por 120 minutos y

a pH 8,5 es estable hasta los 60 minutos, ya que conserva una actividad residual relativa de 85,5% y luego disminuye a 76,0% cuando es expuesta hasta los 120 minutos (Fig. 3).

El efecto de la temperatura sobre la actividad del extracto crudo de pectinasa de *Bacillus* spp aislado a partir de muestras de suelo de cultivos de naranja, describe un perfil clásico campaniforme con una máxima actividad alrededor de los 35°C, decreciendo a medida que las temperaturas son más distantes de estos valores (Fig. 4).

Y la temperatura sobre la estabilidad térmica del extracto crudo de la pectinasa de *Bacillus* spp aislado a partir de muestras de suelo de cultivos de naranja, produce pérdida de la estabilidad térmica a partir de los 70°C a los 120 minutos de exposición y no es termoestable a los 90°C (Fig. 5).

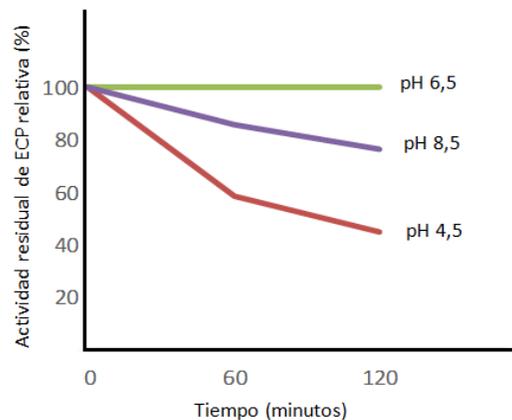


Fig. 3: Estabilidad del extracto crudo de pectinasa (ECP) sometida a diferentes pHs durante 60 y 120 minutos de exposición.

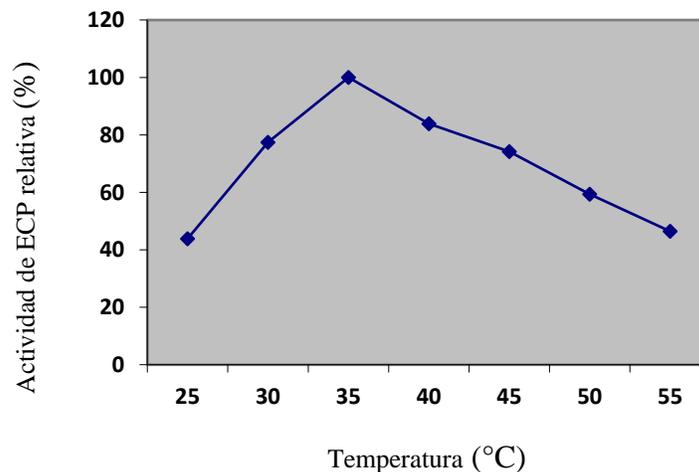


Fig. 4: Efecto de la temperatura sobre la actividad del extracto crudo de pectinasa (ECP)

DISCUSION

La importancia de las pectinasas se ha incrementado por su relevancia comercial en la industria. El crecimiento de *Bacillus* spp en agar y caldo nutritivo suplementado con sales y pectina al 2% evidenció a partir de las 48 horas un mayor desarrollo a pH 6,8 y a la temperatura de 31°C (Tablas 1 y 2). Los valores de pH, temperatura y tiempo de incubación utilizados en el presente trabajo de investigación, no fueron los adecuados, ya que se ha encontrado en la bibliografía revisada el pH oscila entre 5,0 y 9,0 pudiendo ser el óptimo 7,2²³.

Al mismo tiempo, cabe indicar que para la producción de pectinasa en medio líquido, la bibliografía reporta que para una mejor producción se necesita aireación y agitación, lo que permitiría un mayor crecimiento de especies de *Bacillus* (0.5 vvm para la aireación y de 300 rpm para la agitación)²⁴.

La producción de pectinasas por *Bacillus* en medio líquido (Tabla 2), se ha encontrado datos que la enzima alcanza su mayor rendimiento al final de la etapa logarítmica del crecimiento microbiano, lo cual estaría a partir de las 72 horas (3 días) de incubación, dependiendo de la especie, hasta los 5 ó 7 días de incubación²⁴, motivo por el cual se ha obtenido muy poca cantidad de pectinasa ya que éstas son enzimas inducidas lentamente por la presencia de sustancias pécticas.

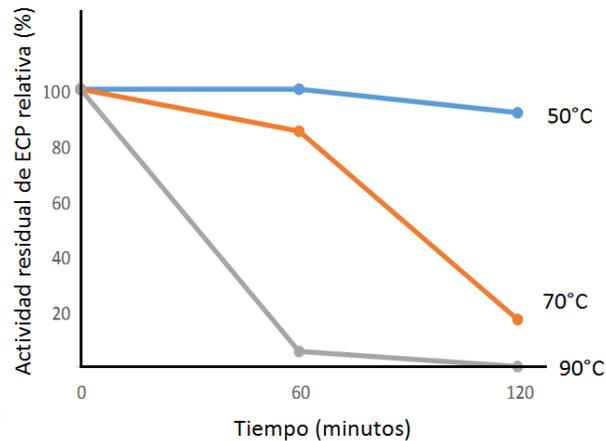


Fig. 5. Termoestabilidad del extracto crudo de pectinasa (ECP) sometida a diferentes temperaturas durante 60 y 120 minutos de exposición.

La disminución de la actividad de pectinasa, respecto al pH, podría atribuirse al pH de crecimiento del *Bacillus* y a su lenta capacidad de adaptación para la producción de la enzima en los diferentes valores de pH trabajados.

Respecto a la temperatura, se ha encontrado que la máxima temperatura de actividad de la pectinasa está alrededor de 35°C, lo que concuerda con algunos autores donde manifiestan que ésta oscila entre los 25 y 40°C²³. Se ha encontrado que la temperatura para la producción de pectinasa, depende de la especie de *Bacillus*. Por ejemplo, la temperatura óptima entre 50 y 60°C permite obtener la enzima de las especies *Bacillus* spp, con *B. stearothermophilus* muestra alta actividad a 60°C, mientras que *B. cereus* y *B. subtilis* presenta excelente actividad a 50°C.

Estudios respecto a la termoestabilidad de la pectinasa de ciertos *Bacillus*²⁵ coinciden con los obtenidos en el presente trabajo. Esta enzima es estable a 45°C durante 120 minutos (2 horas), se reduce un poco a 50°C y a los 60°C casi se ha reducido al 50% su actividad residual y a los 70 y 80 °C ha perdido toda su actividad residual. Es importante mencionar que la actividad de algunas pectinasas depende de la presencia del ión Ca²⁺: La enzima de cepas de *Bacillus* spp degradan el ácido de poligalacturónico presenta una actividad máxima alrededor del pH 10.5 y a una temperatura entre 50 y 55°C²⁴.

Por los resultados obtenidos en la presente investigación, cabe indicar la importancia de monitorear las condiciones de trabajo para producir más y mejor pectinasa a partir de los *Bacillus* spp aislados, ya que en medio sólido muestran buena producción de la enzima y cuando se pasa al medio líquido se presentan problemas que aún no se han podido solucionar del todo, por lo que sería de suma importancia mejorar y/o optimizar las condiciones de incubación (medio sumergido), el tipo y calidad de sustrato (carbono y nitrógeno), la presencia y cantidad de ciertos activadores, el pH, la temperatura, el tiempo de incubación para la máxima producción de la enzima y algunos inhibidores que podrían estar disminuyendo dicha producción de la enzima.

CONCLUSIONES

- Los *Bacillus* spp aislados de suelos de tierra de cultivo de papa y de naranja presentan diferentes grados de hidrólisis pectinolítica.
- El perfil de actividad de la pectinasa de *Bacillus* spp respecto al pH es campaniforme y la máxima actividad está alrededor de 6,5.
- La pectinasa de *Bacillus* spp es pH-estable a los pH 6,5 y 8,5 durante los 120 minutos de exposición.
- El perfil de actividad de la pectinasa de *Bacillus* spp, respecto a la temperatura es campaniforme y la máxima actividad está a 35°C.
- La pectinasa de *Bacillus* spp es termoestable hasta temperaturas menores e iguales a 50°C y a temperaturas superiores de 70°C pierde su termoestabilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Devia J. Proceso para producir pectinas cítricas. Rev. Univ. EAFIT. 2003; (129): 21-30.
2. Feoli M, Gómez Z, Muños A. Aislamiento y caracterización de microorganismos con actividad pectinolítica a partir de *Mangifera indica*. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm. 1997; (26): 33-37.
3. Yegres S, Sánchez J, Belmar M, Riveros W, Belmar D. Producción de enzimas pécticas-ensayos preliminares. Rev. Univ. Or. 2001; 13(1): 55-59.
4. Beltrán A, Larrondo C, Ramirez M, Ruiza A, Salgado L. Producción de pectinasas por *Aspergillus niger* a partir de cáscaras de naranja y de toronja como fuente de carbono. 2011. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
5. Bayoumi R, Yassin H, Swelim M, Abdell-All E. Production of bacterial pectinase(s) from agro-industrial wastes under solid state fermentation conditions. J App Sci Research. 2008; 4(12): 1708-1721.
6. Silva D, Da Silva E, Da Silva R, Gomes E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by products. Brazilian Journal of Microbiology. 2002; (33): 318-324.
7. Nadaroglu H, Taskin E, Adigüzel A, Güllüce M, Demir N. Production of a novel pectin lyase from *Bacillus pumilus* (P9), purification and characterization and fruit juice application. Romanian Biotechnological Letters. 2010; 15(2): 5167-5175.
8. Kashyap D, Vohra P, Chopra S, Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Bioresource Technology. 2001; 77: 215-227.
9. Arroyo G. Producción de enzimas pectinasas por actinomicetos en cultivo sumergido utilizando pectina y cáscara de naranja. [Tesis Msc.]. 2002. UNMSM. Perú.
10. Soriano M. Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 e YvpA de *Bacillus subtilis*. [Tesis Doctoral]. 2004. Universidad de Barcelona.
11. Cabeza M, Merín M, Martín M, Sabaté D, Audisio M, Morata V. Effect of a Pectinase-Surfactin Preparation on Extraction of Pigments and Total Polyphenol from Malbec Grape Skins. American Journal of Enology and Viticulture. 2009; 60(4): 477- 483.
12. Trejo M. Producción de pectinasas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre soporte. Micol. Neotrop. Apl. 1991; (4): 49-62.
13. Maldonado Y, Salazar S, Millones C, Torres E, Vásquez E. Extracción de pectina mediante el método de hidrólisis ácida en frutos de maushan (*Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo) provenientes del distrito de San Miguel de Soloco, región Amazonas. Rev. Aporte Santiaguino. 2010; 3(2): 177-184.
14. Chamorro M, Gutiérrez Chapoñán. Extracción de pectina a partir de la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*), toronja (*Citrus paradisi*) y pomelo (*Citrus grandis*). 2010 Nov 18; Lima, Perú. Centro de investigación de tecnología de alimentos. Universidad Peruana Unión.
15. Guidi A, Arandía M. Obetnción de pectina a partir de la cáscara de maracuyá mediante hidrólisis ácida. J Boliviano de Ciencias. 2010; 67-71.
16. Calvo P, Zúñiga D. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus spp.* aisladas de la rizósfera de papa (*solanum tuberosum*). Ecología aplicada. 2010; 9(1).
17. Piñero J, Vidal L, Coello N. Aislamiento y caracterización de una cepa de *Bacillus spp* degradadora de plumas de aves de corral. Rev. Científica, FCV-LUZ. 2000; 10(2): 124-129.

18. Ramos E, Zúñiga D. Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecol Apl.* 2005; 7(1,2): 123-130.
19. Reinoso Y, Casadesús L, García A, Gutiérrez J, Álvarez V. Aislamiento, selección y identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad.* 2006; 10(3): 187-191.
20. Cuervo J. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. *Microbiología agrícola y veterinaria.* [Tesis para optar título]. 2010. Universidad Javeriana. Bogotá D.C.
21. Fernandes-Salomão, T. M.; Rodrigues Amorim, A. C.; Chaves-Alves, V. M., Cavalcante Coelho, J. L; Olzany Silva, D; Fernandes de Araújo, E. (1996). Isolation of pectinase Hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. *Rev. Microbiol. São Paulo*, 27, 15-18.
22. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantization of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 1976; 72: 248-254.
23. Kashyap, D.R.; Chandra, S.; Kaul, A.; Tewari, R. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 2000. 16: 277 - 282.
24. Torimiro N.; Okonji, R. E. A comparative study of pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species. *African Journal of Biotechnology.* 2013. Vol. 12(46), 6498 – 6503.
25. Nadaroglu, H.; Taskin, E.; Adiguzel, A.; Gulluce, M.; Demir N. Production of a Novel Pectin Lyase from *Bacillus pumilus* (P9), Purification and Characterisation and Fruit Juice Application. *Romanian Biotechnological Letters*, 2010. 15, (2): 5167-5176.



Efecto de *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana* sobre el ácaro *Panonychus citri* en condiciones de laboratorio

Effect of *Beauveria bassiana* and *Lecanicillium lecanii* on mite *Panonychus citri* under laboratory conditions

Erika P. Alayo-Aguirre¹ y Juan H. Wilson-Krugg².

¹Exalumna de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.

²Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo.

RESUMEN

Se evaluó el efecto patogénico de *Lecanicillium lecanii* (Zimm) y *Beauveria bassiana* (Bals.) sobre el ácaro rojo de los cítricos, *Panonychus citri*, en condiciones de laboratorio. Se realizaron cinco tratamientos con tres repeticiones cada uno: (i) al primero se le aplicó Tween 80 al 0.1% , (ii) al segundo y tercero, una suspensión de *L. lecanii* a las concentraciones de 10⁶ con/mL y 10⁷ con/mL, respectivamente, y (iii) al cuarto y quinto, una suspensión de *B. bassiana* a las concentraciones de 10⁶ con/mL y 10⁷ con/mL, respectivamente. Luego de la inoculación con los hongos entomopatógenos, los especímenes de *P. citri* presentaron lentitud en movimiento, alteración en el color del tegumento y muerte. Los ácaros muertos fueron colocados en cámara húmeda hasta la aparición de micelio, el cual fue aislado en agar papa sacarosa con antibiótico para su posterior observación microscópica y determinación. Se encontró que el menor porcentaje de supervivencia del ácaro fue frente a *B. bassiana* con un 17% y 6% a las concentraciones de 10⁶ con/mL y 10⁷ con/mL ($p < 0,05$), mientras que con *L. lecanii* el porcentaje de supervivencia fue de 29% y 20% a las concentraciones de 10⁶ con/mL y 10⁷ con/mL ($p > 0,05$). Se concluye que, en condiciones de laboratorio, *B. bassiana* tuvo efecto entomopatógeno sobre las ninfas y adultos de *P. citri*, observándose un menor porcentaje de supervivencia del ácaro al incrementar la concentración de conidias del hongo, mientras que *L. lecanii* no tuvo efecto entomopatógeno sobre las ninfas y adultos de *P. citri*.

Palabras clave: Entomopatógenos, *Lecanicillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *Panonychus citri*

ABSTRACT

The pathogenic effect of *Lecanicillium lecanii* (Zimm) and *Beauveria bassiana* (Bals.) on citrus red mite, *Panonychus citri*, in laboratory conditions was evaluated. Five treatments with three replicates each were performed: (i) the first was applied to 0.1% Tween 80, (ii) the second and third, a suspension of *L. lecanii* at concentrations of 10⁶ / mL and 10⁷ / mL, respectively, and (iii) the fourth and fifth, a suspension of *B. bassiana* at concentrations of 10⁶ / mL and 10⁷ / mL, respectively. After inoculation with the entomopathogenic fungi *P. citri* specimens showed slow motion, color alteration of the integument and death. The dead mites were placed in a moist chamber until the appearance of mycelium, which was isolated on potato sucrose agar antibiotic for subsequent microscopic observation and determination. It was found that the lowest percentage of mite survival against *B. bassiana* was 17% and 6% at concentrations of 10⁶/10⁷ mL and / mL ($p < 0.05$), whereas *L. lecanii* the survival rate was 29% and 20% at concentrations of 10⁶ / mL and 10⁷ / mL ($p > 0.05$). We conclude that, under laboratory conditions, *B. bassiana* entomopathogenic took effect on nymphs and adults of *P. citri*, with a smaller percentage of mite survival by increasing the concentration of conidia of the fungus, while *L. lecanii* had no effect entomopathogenic on nymphs and adults of *P. citri*.

Keywords: Entomopathogens, *Lecanicillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *Panonychus citri*

INTRODUCCIÓN

El cultivo de los cítricos en el Perú ha adquirido significativa importancia debido a los elevados niveles de consumo tanto en el mercado interno como externo y se encuentra más desarrollada, desde el punto de vista agronómico y comercial, en la costa central¹. No obstante, tal desarrollo se encuentra amenazado por enfermedades y plagas que afectan de modo negativo la producción de este cultivo, como es el caso de la araña roja de los cítricos, *Panonychus citri*^{2,3}.

P. citri desarrolla de huevo a adulto en sólo 13 días: el huevo en siete días y los estados inmaduros activos en seis; los adultos hembras viven un promedio de 15 días, oviponen un promedio de 50 huevos en el transcurso de su vida, de modo tal, que en el campo se pueden desarrollar de 12 a 15 generaciones cada año, aspecto que repercute negativamente en la producción de cítricos, porque además de los adultos las larvas y ninfas se alimentan de hojas y frutos deteriorándolos^{4,5,6}.

Las máximas densidades poblacionales de *P. citri* ocurren frecuentemente en primavera y en otoño y se ha observado que la dinámica poblacional está influenciada por el clima (desarrolla mejor a 25°C y a 65 ± 10 % HR), estado vegetativo de la planta, prácticas agronómicas y enemigos naturales; en efecto, las elevadas temperaturas son letales para todas las formas móviles y las bajas temperaturas prolongan el tiempo de desarrollo y reducen la actividad alimenticia, la humedad relativa tiene un marcado efecto en el número de huevos colocados por la hembra, por lo que los extremos de ésta no solo reducen la fecundidad, sino que también aumentan la mortalidad^{7,8,9,10,11}.

El control de la “araña roja” se efectúa mediante el uso de sustancias químicas; sin embargo, resulta costoso, destruye a los controladores benéficos, influye sobre la planta provocando ciertos cambios en la constitución de sus tejidos que resultan favorables para el desarrollo de la plaga y, sobre todo, desarrolla con facilidad resistencia a los plaguicidas^{12,13}. Ante ello, el uso de hongos entomopatógenos surge como una buena alternativa de control porque son estables, eficaces y pueden aplicarse en completa armonía con las diferentes técnicas usadas en esquemas de manejo integrado^{15,16}.

En tal contexto, puede ser de utilidad *Lecanicillium lecanii*, hongo entomopatógeno de amplia distribución, que ocasiona epizootias de gran magnitud en ambientes cálidos y húmedos (humedad relativa encima de 80% y temperatura entre 20 a 25°C), en un amplio rango de hospederos: insectos de los órdenes Homoptera, Coleoptera, Diptera y Lepidóptera y ácaros de la familia Tetranychidae^{17,18}. Igualmente, *Beauveria bassiana*, otro hongo cosmopolita, que posee gran actividad entomopatógena contra diversas especies de insectos correspondientes a los órdenes Coleóptera, Lepidóptera, díptera, heteróptera, Homóptera y también contra los ácaros de la Familia Tetranychidae^{19,20}.

Teniendo en cuenta la importancia de *P. citri* como plaga en los campos citrícolas del Perú y que no se ha investigado la actividad de hongos entomopatógenos frente a ella, se planteó la presente investigación que estuvo dirigida a determinar el efecto de *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana* sobre la araña roja de los cítricos, *P. citri*, en condiciones de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

- Cultivos puros de *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana* proporcionados por la Cátedra de Fitopatología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo.
- Especímenes adultos y de estadío ninfal de *Panonychus citri* provenientes de la crianza masiva en el mismo laboratorio.

Recolección e identificación de *Panonychus citri*

Se realizó la recolección de hojas de naranjo infestados con *P. citri*, las cuáles se retiraron de la planta con ayuda de tijeras, se colocaron en bolsas de papel dentro de una caja de cartón y se trasladaron al Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo. Para la determinación de *P. citri* se realizaron observaciones bajo el estereoscopio utilizando pinceles

entomológicos, teniendo en cuenta la coloración de los ácaros, las setas o pelos dorsales y los tubérculos prominentes del mismo color que el tegumento.

Crianza de *Panonychus citri*

La crianza se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo y consistió en colocar esponjas dentro de bandejas de plástico (35x25x5cm), sobre el lecho de esponjas se colocó papel toalla y sobre ellos se depositaron hojas de *Citrus limon* "limón" previamente lavadas y secadas, los bordes de las hojas fueron rodeados con papel toalla para evitar la huida de los ácaros. La esponja se mantuvo constantemente húmeda y las hojas eran cambiadas conforme se marchitaban, cada 8 días. Se infestó cada hoja con diferentes estadios poblacionales de *P. citri*, teniendo en cuenta la misma cantidad de individuos por hoja. La crianza se realizó a 22- 25°C y a 70% H.R aproximadamente.

Reactivación de *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana*

A partir de los cultivos puros de *L. lecanii* y *B. bassiana* se hicieron suspensiones con Tween 80 al 0.1 %. Se seleccionaron dos bandejas de crianza con 30 individuos de *P. citri* cada una y se realizó la inoculación por aspersión. Los ácaros muertos fueron sometidos a condiciones de cámara húmeda, que consistió en colocarlos en una lámina porta objeto ubicada dentro de una placa de Petri estéril, la cual contenía algodón humedecido en agua destilada estéril. Las cámaras se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días hasta la aparición de micelio sobre la superficie de los ácaros muertos. En condiciones de esterilidad se transfirió el micelio que emergió sobre los ácaros, en tubos con Agar Papa Sacarosa y se llevaron a incubación durante 7 días a temperatura ambiente, para obtener cultivos puros reactivados. Se determinó taxonómicamente al hongo en base a las características morfológicas macroscópicas¹⁴

Propagación y estandarización del inóculo de *L. lecanii* y *B. bassiana*

Los hongos reactivados en el paso 2.3 fueron sembrados por el método de superficie en frascos planos conteniendo Agar Papa Sacarosa, los que se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días. Posteriormente a partir de los cultivos obtenidos en los frascos planos se preparó una suspensión de conidias en Tween 80 al 0.1 %, y se estandarizó con la ayuda de la cámara de Neubauer a una concentración de 10^6 y 10^7 con/mL para ambos hongos.

Inoculación de los hongos entomopatógenos *L. lecanii* y *B. bassiana*

Se aplicaron cinco tratamientos con tres repeticiones cada uno, destinándose cuatro tratamientos para el grupo problema y uno para el grupo control. Cada uno de los cinco tratamientos estuvieron conformados por 30 individuos entre ninfas y adultos de *P. citri*. Al primer y al segundo tratamiento se les inoculó por aspersión, suspensiones de *L. lecanii* a las concentraciones de 2×10^6 con/mL y 2×10^7 con/mL respectivamente, al tercer y cuarto tratamiento se les aplicó suspensiones de *B. bassiana* a las concentraciones de 2×10^6 con/mL y 2×10^7 con/mL respectivamente. El último tratamiento fue destinado para el grupo control al cual se le aplicó Tween 80 al 0.1%. Todos los tratamientos se mantuvieron a 22-25°C y a 70% H.R aproximadamente¹³.

Evaluación de la actividad entomopatógena de *L. lecanii* y *B. bassiana*

• Observación de síntomas y/o signos

Después de la inoculación se evaluó diariamente en los grupos problemas la aparición de síntomas y/o signos de infección micótica, en comparación con el grupo control. Los síntomas evaluados fueron la carencia de coordinación, pigmentación, comportamientos alterados como movimientos lentos y la parálisis del ácaro, muerte y finalmente como signo la aparición de micelio sobre la exocutícula, siendo el tiempo máximo de observación 14 días.

• Aislamiento y confirmación de *L. lecanii* y *B. bassiana*^{13,20}

Para determinar, si los hongos entomopatógenos fueron los que originaron la muerte a *P. citri*, los ácaros muertos con síntomas de ataque fúngico fueron sometidos a condiciones de cámara húmeda con la finalidad de que si el hongo estuviera colonizando el interior del ácaro, se desarrolle y cubra la superficie exocuticular con micelio. Para ello, se colocó a los ácaros muertos en una lámina porta objeto ubicada en una placa de Petri estéril que contenía

algodón humedecido en agua destilada estéril., las cámaras húmedas se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días hasta la aparición de micelio sobre la superficie de los ácaros muertos. Con una asa bacteriológica y en completa esterilidad se transfirió el micelio que emergió sobre el ácaro hacia tubos conteniendo Agar Papa Sacarosa inclinado, los que se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días. Luego se procedió a la confirmación del hongo basándose en las características morfológicas macroscópicas, microscópicas y haciendo uso de las claves taxonómicas propuestas por Barnett y Hunter¹⁴.

• **Determinación del Porcentaje de mortalidad y análisis estadístico**²³

Para la determinación del porcentaje de muerte se empleó la fórmula de Abbott.

$$Mc = \frac{Mo - Mt}{100 - Mt} \times 100$$

Dónde: Mc = Porcentaje de mortalidad corregida; Mo = Porcentaje de mortalidad del tratamiento u observada; Mt= Porcentaje de muerte en el testigo.

• Los promedios del porcentaje de mortalidad fueron analizados mediante el Análisis de Varianza (ANAVA) con un nivel de confianza del 95% y para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos estudiados⁶.

RESULTADOS

La aplicación tanto de *L. lecanii* como de *B. bassiana* en las ninfas y adultos del ácaro *P. citri* determinó la aparición de signos y síntomas que condujeron a la muerte (Tabla 1). Se verificó que la sintomatología y muerte fueron provocadas ppor los entomopatógenos (Figs. 1 y 2).

El porcentaje de supervivencia de ninfas y adultos de *P. citri* frente a la concentración de 10⁶ con/mL de *L. lecanii* fue de 29%, mientras que a la concentración de 10⁷ con/mL fue de 20%, a los 14 días de evaluación (Fig. 3). En tanto, el porcentaje de supervivencia de ninfas y adultos de *P. citri* frente a la concentración de 10⁶ con/mL de *B. bassiana* fue de 17%, mientras que a la concentración de 10⁷ con/mL fue de 6%, a los 7 días de evaluación (Fig. 4).

Tabla 1. Síntomas y/o signo observados en ninfas y adultos de *Panonychus citri* después de la aplicación de *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana* en condiciones de laboratorio.

SÍNTOMAS/SIGNO	TRATAMIENTOS		
	Control *	<i>Lecanicillium lecanii</i>	<i>Beauveria bassiana</i>
Movimientos lentos	-	+	+
Alteración en el color del tegumento	-	+	+
Muerte	-	+	+
Aparición de micelio sobre los ácaros	-	+	+

*: Tween 80 al 0.1%; +: Presencia de síntoma o signo; - : Ausencia de síntoma o signo



Fig. 1. Adulto de *Panonychus citri*. A. Sin inocular (control); B. Inoculado con *Lecanicillium lecanii* (nótese la coloración oscura); C) Micelio de *L. lecanii* cubriendo la superficie de *P. citri*, D) Fiálides típicas de *L. lecanii* creciendo en la superficie de *P. citri*.

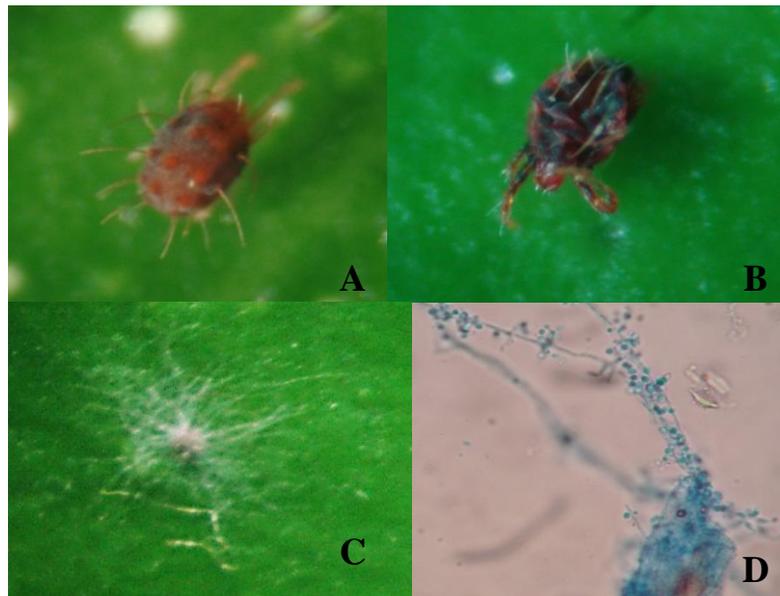


Fig. 2. Adulto de *Panonychus citri*. A. Sin inocular (control) B) Inoculado con *Beauveria bassiana* (nótese la coloración oscura); C) Micelio de *B. bassiana* cubriendo la superficie de *P. citri*, D) Disposición típica de conidias de *B. bassiana* en la superficie de *P. citri*,

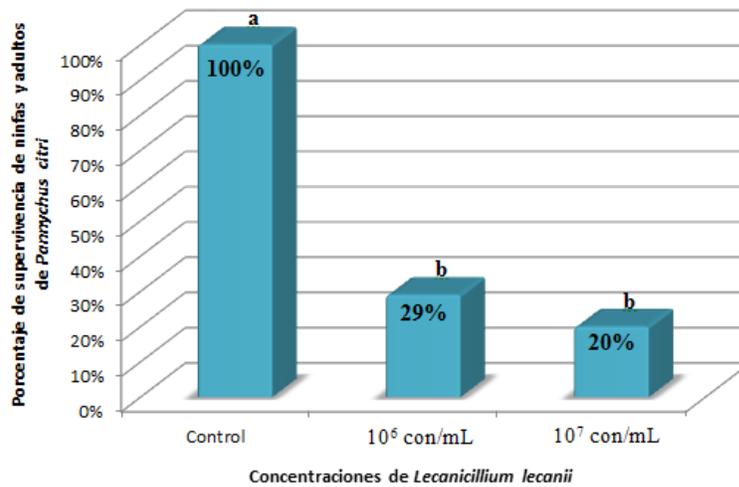


Fig. 3. Porcentaje de supervivencia de ninfas y adultos de *Panonychus citri* inoculados con *Lecanicillium lecanii* a las concentraciones de 10⁶ con/mL y 10⁷ con/mL, a los 14 días de evaluación. (a: p < 0.05, existe diferencia significativa; b: p > 0.05, no existe diferencia significativa).

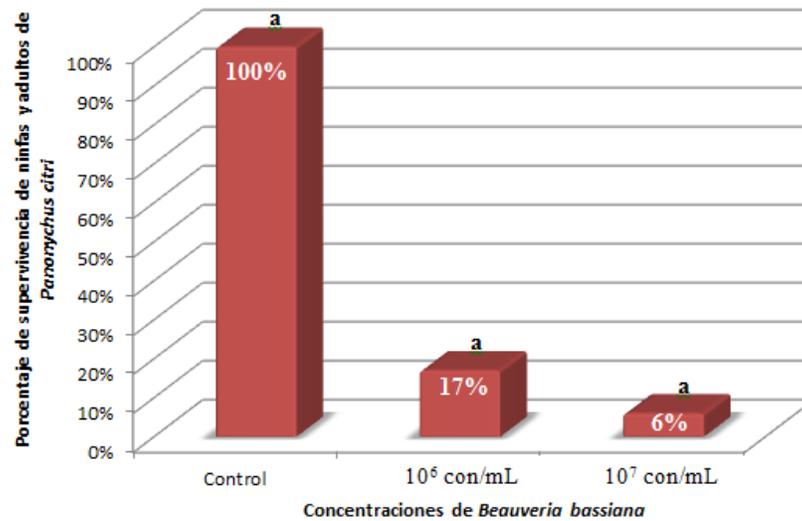


Fig. 4. Porcentaje de supervivencia de ninfas y adultos de *Panonychus citri* inoculados con *Beauveria bassiana* a las concentraciones de 10⁶ con/mL y 10⁷ con/mL, a los 7 días de evaluación. (a: p < 0.05, existe diferencia significativa entre los tratamientos).

DISCUSION

Los síntomas y signo observados en especímenes de los estadios de ninfa y adulto de *P. citri* luego de la aplicación de los hongos entomopatógenos *L. lecanii* y *B. bassiana* se deberían a la acción directa de éstos; es decir, para que tales síntomas se presenten ocurrió previamente un proceso de patogénesis, el cual se inicia con la adhesión de una conidia de los hongos inoculados a la cutícula de *P. citri*, siendo necesario el reconocimiento y compatibilidad (por ejemplo de enzimas y glicoproteínas) entre el conidio y las células del tegumento del ácaro, la que estuvo influida por dos acciones: una pasiva en la cual se ejercen fuerzas electroestáticas e hidrofóbicas y; otra activa en la cual se secretan mucílagos que interactúan químicamente con las lecitinas de la membrana generando un ambiente favorable para la secreción de enzimas. Luego de la adhesión, se inicia la germinación, que es dependiente de las condiciones que le pueda brindar el insecto y el ambiente para que la conidia germine^{20,21}

Carvalho²² menciona que *L. lecanii* y *B. bassiana* requieren una humedad relativa mayor a 70% y temperatura de 20 a 25°C, siendo la temperatura durante la investigación de 20 a 22°C y la humedad relativa de 70 a 75% aproximadamente, las que favorecieron la formación del tubo germinativo iniciando la penetración en la cutícula del ácaro, involucrando este proceso a diversos mecanismos enzimáticos y procesos físicos. Perdakis *et al.*²³ mencionan que las enzimas que participan en la penetración son proteasas, quitinasas y lipasas que actúan de forma secuencial, degradando la cutícula y liberando nutrientes para el hongo. Cazorla y Morales³⁹ mencionan además que estos hongos entomopatógenos al invadir a los Tetránquidos tienden a localizar sus hifas en el centro del hemocele, y producir toxinas como bassinolide (*L. lecanii*) y beauvericina, beauverolidasas, bassianolidasas e isarolidasas (*B. bassiana*) las que actúan bloqueando el aparato digestivo, además de tener acción histolítica, afectando el sistema nervioso y muscular produciendo síntomas como lentitud en sus movimientos (Tabla 1). Al llegar a la hemolinfa se transforman morfológicamente en blastosporas y cuerpos filamentosos de hifas que invaden el sistema inmune del hospedero multiplicándose rápidamente en los tejidos. En el mismo sentido, Prasad y Syed²⁴ mencionan que en esta etapa se activa el sistema inmune del insecto a través de los procesos de melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento; siendo la melanina la sustancia responsable del oscurecimiento del tejido, síntoma observado en la investigación (Fig. 1 y 2).

Luego de que los mecanismos de defensa del ácaro son sobrepasados, el hongo entomopatógeno entra en la fase de colonización agotando los nutrientes y el agua presente su interior, ocurriendo la muerte del hospedante, producto de la necrosis el cadáver se torna oscuro, se deshidrata y momifica²⁵. Luego ocurre la fase saprofítica de crecimiento micelial hacia el exterior (Fig. 1 y 2). Motta y Murcia¹⁴ mencionan que las hifas emergen de los cadáveres de insectos a través de la boca, ano, apéndices y aberturas genitales que concluye con la producción de nuevas unidades reproductivas (conidios) sobre la superficie cubriendo el cuerpo del ácaro. Todos los síntomas y signo observados y descritos en los grupos problema no se observaron en el grupo control.

Al incrementarse la concentración desde 10^6 a 10^7 con/mL de *L. lecanii*, el porcentaje de supervivencia de *P. citri* disminuyó de 29% a 20% respectivamente; sin embargo, esto es aparente porque al realizar el análisis estadístico se encontró que esta diferencia no era significativa, si existiendo diferencia significativa entre dichas concentraciones y el control; esto significa que las dos concentraciones empleadas tienen el mismo efecto sobre los individuos de *P. citri*, lo que se significaría que a la concentración de 10^6 con/mL *L. lecanii* llega a un umbral de infección, siendo la concentración de inóculo aplicada la máxima efectiva y que al aumentar la concentración de la dosis, no se generara mayor muerte en los ácaros, obteniéndose resultados con porcentajes de supervivencia que no varían estadísticamente. Estos resultados difieren con los hallazgos de Diaz *et al.*¹⁸, quienes observaron que especímenes de *Myzus persicae* presentaban una supervivencia del 0 % al ser inoculados con dosis de 1×10^9 con/mL de *L. lecanii*, concentración que fue más alta que la empleada en esta investigación, esto se puede deber a que *P. citri* presenta una mayor susceptibilidad a bajas concentraciones de conidios de *L. lecanii* que *M. persicae*²⁶. Ghosh *et al.*²⁵ encuentran que *L. lecanii* disminuía a la población de *Tetranychus*

urticae observando un porcentaje de supervivencia del 30% a la concentración de 6.5×10^6 con/mL, resultados similares a los obtenidos en la investigación; asimismo Amjad *et al*⁶ informan que al incrementar las concentraciones de *L. lecanii* de 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 con/mL, disminuye el porcentaje de supervivencia de hembras adultas de *T. urticae*, disminuyendo también el porcentaje de eclosión de huevos disminuye.

Asimismo, al incrementar la concentración de 10^6 a 10^7 con/mL de *B. bassiana*, el porcentaje de supervivencia disminuyó de 17% a 6% respectivamente, resulta real porque el análisis estadístico se encontró que existía diferencia significativa entre la supervivencia obtenida a las dos concentraciones de conidios empleadas, así como también existe diferencia significativa entre dichas concentraciones y el grupo control. Esto significa que las dos concentraciones empleadas no tienen el mismo efecto sobre los individuos de *P. citri*, y que dicho efecto se va acentuando conforme se incrementa la concentración de *B. bassiana*. Con los resultados obtenidos por Sanheedep *et al*⁷ demuestran que el más bajo porcentaje de supervivencia de larvas de *Spodoptera litura* fue registrada a la concentración de 2.03×10^9 con/ml, concentración que fue más alta que la empleada en esta investigación, asimismo Prasad y Syed²⁴ informaron que el porcentaje de supervivencia de larvas de *Helicoverpa armigera* fue de 13.3% al ser tratadas a la concentración de 0.25×10^8 con/ml de *B. bassiana*, esto podría atribuirse a la dosis de inóculo empleada y a la patogenicidad del aislamiento con el que ellos trabajaron.

CONCLUSIONES

- *Beauveria bassiana* tiene efecto entomopatógeno sobre las ninfas y adultos de *Panonychus citri*, en condiciones de laboratorio; disminuyendo el porcentaje de supervivencia del ácaro al incrementarse la concentración de conidios del hongo.
- *Lecanicillium lecanii* tiene un efecto entomopatógeno sobre las ninfas y adultos de *Panonychus citri* en condiciones de laboratorio, no existiendo diferencia significativa entre las concentraciones empleadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. León MG. Insectos de los cítricos. Colombia: Edit. Artes y Letras S.A.S. 2012.
2. Guanilo A, Martínez N. Predadores asociados a *Panonychus citri* McGregor (Acari: Tetranychidae) en la costa central del Perú. Ecol Aplic 2007; 6(1,2):118-129.
3. García F, Rivero M. El ácaro rojo *Panonychus citri*, nueva plaga de los cítricos en España. Bol Serv Plagas 1981; 7: 65-77.
4. Caraka I. Life table of Citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor) (Acarina: Tetranychidae) in laboratory. Turk Entomol Derg 1994; 18(2): 65-70.
5. Kasap I. The biology and fecundity of the citrus red mite *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) at different temperatures under laboratory conditions. Turk J Agric For 2009; 3: 593-600.
6. Puspitarini RD, Rauf A, Sosromarsono S, Santoso T, Santoso S. Abundance of citrus red mite *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae), other mites and its natural enemies at several citrus plantation locations. J Agric Food Tech 2011; 1(11): 212-217
7. Swirski E, Gokkes M. Phenology and natural enemies of the citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor) in Israel. Israel J Entomol 1986; 20: 37-44.
8. Badii MH, Landeros J, Cerna E. Regulación poblacional de ácaros plaga de impacto agrícola. Intern J Good Conscience 2010; 5(1): 270-302.
9. Baker R. Pest risk assessment made by France on *Panonychus citri* considered by France as harmful in French overseas departments of French Guiana and Martinique. EFSA J 2008; 679: 1-17.
10. Guanilo A, Martínez N. Biología y comportamiento de *Amblyseius chungas* Denmark y Muma (Acari: phytoseiidae) como predador de *Panonychus citri* (Acari: tetranychidae). J Econ Entomol 1990; 83(3): 946-951.

11. Hare DJ, Pehrson JE, Clemens T, Menge JA, Coggins CW. Effects of managing citrus red mite (Acar: tetranychidae) and cultural practices on total yield, fruit size, and crop value of navel orange. J Econ Entomol 1990; 83(3): 976-984.
12. Jamieson LE, Stevens PS. Miticides against citrus red mites (*Panonychus citri*). New Zealand Plant Protection 2009; 62: 302-309.
13. Cisneros F, Sarmiento J. Dos ensayos sobre el control químico de la “araña roja de los cítricos”, *Panonychus citri* (McGregor) en La Esperanza, Huaral. Rev Per Ent 1966; 9(1): 110-117.
14. Hunter B, Barnett H. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th ed. California, USA: APS Press. 1968.
15. Motta-Delgado PA, Murcia-Ordoñez B. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. J Appl Sci 2011; 6 (2): 77-90.
16. Garcia-Mari F, Santaballa E, Ferragut F, Marzai C, Colomer P, Costa J. El ácaro rojo *Panonychus citri* (MacGregor) incidencia en la problemática fitosanitaria de nuestros agríos. Bol Serv Plagas 1983; 9:191-218.
17. Shinya R, Watanabe A, Aiuchi D, Tani M, Kuramochi K, Kushida A Koike M. Potential of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) hybrid strains as biological control agents for soybean cyst nematode: Is protoplast fusion an effective tool for development of plant-parasitic nematode control agents. Japanese J Nematol 2008; 38(1): 9-18.
18. Ayala Zermeño M, Mier T, Sánchez Robles J, Toriello C. Variabilidad intraespecífica del crecimiento de *Lecanicillium lecanii* por efecto de la temperatura. Rev mexicana Micol 2005; 20: 93-97.
19. Diaz B, Oggerin M, Lopez C, Rubio V, Fereres A. Characterization and virulence of *Lecanicillium lecanii* against different aphid species. BioControl 2009; 54: 825-835.
20. Santa-María A, Costa-Comelles J, Alonso A, Rodríguez M, Ferrer J. Ensayo del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin para el control de la mosca blanca de los cítricos *Aleurothrixus floccosus* (Maskell) (Homoptera: Aleyrodidae) y su acción sobre el parásito *Cales noacki* (Howard) (Hymenoptera: Aphelinidae). Bol San Veg Plagas 1998; 24: 695-706.
21. **Cazorla Perfetti D, Morales Moreno P.** Effect of different concentrations of *Beauveria bassiana* on development and reproductive potential of *Spodoptera litura* (Fabricius). J Biopesticides 2011; 4 (2): 161-168.
22. Carvallo M, Guharay F. Control Biológico de plagas agrícolas. España: Edit. Managua. 2004.
23. Perdakis D, Kapaxidi E, Papadoulis G. Biological control of insect and mite pests in greenhouse solanaceous crops. European J Plant Scie & Biotech 2008; 2(1): 125-144
24. Prasad A, Syed N. Evaluating Prospects of Fungal Biopesticide *Beauveria Bassiana* (Balsamo) Against *Helicoverpa Armigera* (Hubner): An Ecosafe Strategy for Pesticidal Pollution. Asian J Exp Biol Sci 2010; 1 (3): 78-83.
25. Ghosh SK, Shivaprakash THM, Kharderr Khan H. Susceptibility of two spotted red spider mites, *Tetranychus urticae* (Koch) (Acarina: Tetranychidae) against entomofungal pathogens. J Biol Control 2007; 21:183-186.
26. Cavallazi G, Prieto A, Ariza R. Evaluación del entomopatógeno *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas en el control de la mosca blanca *Philephedra tuberculosa* Nakahara y Gill en guanábana (*Anoa muricata*). Agron Colombiana 1998; 15 (2): 106-111.
27. Sanehdeep K, Harminder PK, Kirandeep K, Amarjeet K. Effect of different concentrations of *Beauveria bassiana* on development and reproductive potential of *Spodoptera litura* (Fabricius). J Biopesticides 2011; 4 (2): 161-168.



Producción de anticuerpos en *Oryctolagus cuniculus* inmunizados con cultivos rizobianos nativos y cepas patrón

Production of antibodies in *Oryctolagus cuniculus* immunized with native rhizobial strains crops and pattern

Bertha Soriano Bernilla, Adalberto Gonzales Varas, Manuela Luján Velásquez, Jaime Agreda Gaitán y Eduardo Muñoz Ganoza

Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

RESUMEN

Especímenes de *Oryctolagus cuniculus* fueron inmunizados con cultivos rizobianos nativos *Bradyrhizobium* sp, RC-455-02 y *Rhizobium* sp. Rf 167-01 Rf 167-02, así como con Cepas rizobianas patrón: *Bradyrhizobium* sp CIAT 71, *Rhizobium tropici* CIAT 899 y CIAT 632, con la finalidad de producir anticuerpos específicos y comparar los títulos. Las cepas fueron sembradas en medio Agar Levadura Manitol (LMA); los antígenos rizobianos fueron preparados a la concentración de $1,2 \times 10^9$ bact/mL, La inmunización de los conejo se hizo con una mezcla de una emulsión de dos mL de antígeno con dos mL de adyuvante completo de Freund, por vía intramuscular y a las dos y cuatro semanas se inoculó el antígeno con adyuvante incompleto de Freund. Se encontró que la mayoría de sueros inmune presentaba un título de anticuerpo de 1280 contra las diferentes cepas rizobianas empleadas.

Palabras clave: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Oryctolagus cuniculus*, anticuerpos.

ABSTRACT

Oryctolagus cuniculus specimens were immunized with native rhizobial cultures *Bradyrhizobium* sp, RC-455-02 and *Rhizobium* sp. Rf Rf 167-01 167-02 and rhizobial strains with pattern: *Bradyrhizobium* sp CIAT 71, *Rhizobium tropici* CIAT 899 and CIAT 632, in order to produce specific antibodies and compare titles. Strains were plated on Yeast Mannitol Agar (AML); the rhizobial antigens were prepared at a concentration of 1.2×10^9 bact/mL of the rabbit immunization was with a mixture of an emulsion of two mL of antigen plus two mL of complete Freund's adjuvant, intramuscularly and at two to four weeks another inoculation with incomplete adjuvant. It was found that most of the immune sera showed a titer of antibody 1280 against various rhizobial strains employed.

Keywords: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Oryctolagus cuniculus*, antibodies.

INTRODUCCIÓN

Entre los diferentes sistemas biológicos capaces de fijar N₂ atmosférico, la simbiosis que ocurre entre *Rhizobium* y leguminosa constituye el más importante; aportando de esta manera el nitrógeno necesario al ecosistema y a la producción de alimentos¹. En la mayoría de lugares agrícolas la fuente primaria (80%) del nitrógeno ocurre a través de dicha simbiosis; por ello la FBN es de considerable importancia, pues se ha reportado que en leguminosas noduladas, bajo determinadas condiciones ambientales (suelos pobres en este elemento) pueden fijar hasta 325 kg N₂ /Ha /año².

La producción agrícola basada en leguminosas es fundamental para la alimentación humana, especialmente si se encuentra en equilibrio con el ambiente. Es por esta razón que una interacción natural de estas plantas con una bacteria del suelo a nivel de la raíz, es ecológicamente importante, como medida para evitar el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados que deterioran el suelo y contaminan el ambiente³.

La identificación de cepas de *Rhizobium*, sobre todo el aislamiento de cepas nativas, sigue siendo uno de los principales problemas relacionados con estudios de competencia. Dado que no existe ningún método universalmente aceptado, el método de elección depende de las preferencias, experiencia y equipo; es decir, para emprender cualquier tipo de evaluación de cepas de *Rhizobium* en condiciones naturales, competitividad, persistencia en suelo, uso apropiado de inoculantes y en estudios fisiológicos, bioquímicos y genéticos; es indispensable su identificación².

En tal contexto, estudios de la serología de rizobios muestran que existe una especificidad en la simbiosis entre el rizobio y la leguminosa; es decir, siempre y cuando la raíz de la planta hospedera, encuentre durante su desarrollo, rizobios compatibles y eficientes podrán inducir la formación de nódulos completamente efectivos²; esto se verificó utilizando diversas cepas de *Rhizobium* capaces de formar nódulos en habas, *Vicia faba*, mostrando todas ellas una serología diferente⁴. Asimismo, se emplearon cepas de arverjas las cuales fueron enfrentadas con anticuerpos contra las cepas de frijoles y luego del análisis de longitud de los fragmentos de restricción polimórficos, dirigidos a las regiones de ADN que codifica el rRNA y la nodulación, se indicaron que los nódulos de las cepas de *Rhizobium* de *V. faba* se distinguen de los de *Pisum sativum*, *V. villosa*, y *Trifolium spp.*⁴.

La información existente acerca de la especificidad y la variación de efectividad en la fijación de nitrógeno por parte de *Rhizobium*, al igual que la producción de anticuerpos específicos de los rizobios nativos nos ayudaría de manera rápida y segura a identificar a los rizobios específicos infectivos y efectivos y puedan ser empleados con provecho en la agricultura, eliminando en cierta medida los químicos contaminantes.

En este informe se presentan los resultados de una investigación dirigida a determinar el nivel de anticuerpos producidos por *Oryctolagus cuniculus* “conejo” inmunizado experimentalmente con cultivos rizobianos nativos: *Bradyrhizobium* sp. RC-455-02 simbióticamente eficiente en Frejol, *Rhizobium* sp. Rf167-01 simbióticamente eficiente en Frejol, Rf167-02, Rc458-01 y Cepas rizobianos patrón: *Bradyrhizobium* sp CIAT71 y *Rhizobium tropici* CIAT899 y CIAT632.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo Rizobianos:

De la Colección de cultivos rizobianos del Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Nacional de Trujillo se obtuvieron:

- *Bradyrhizobium* sp. nativo RC-455-02 simbióticamente eficiente en Frejol
- *Rhizobium* sp. nativo Rf 167-01 simbióticamente eficiente en Frejol Rf 167 - 02, Rc 458-01

Del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) se obtuvieron las Cepas rizobianos patrón:

- *Bradyrhizobium* sp CIAT 71, aislada de *Stylosanthes guianensis*.
- *Rhizobium tropici* CIAT 899 y CIAT 632

Reactivación de cepas

La reactivación de cada cepa consistió en romper cuidadosamente la ampolla en la mitad de la zona ocupada por el tampón, mediante la ayuda de una lima. Seguidamente se agregó a la ampolla 3 gotas de peptona al 0.1%, tratando de bañar las paredes, con la finalidad de recuperar todas las células de *Rhizobium* que se encontraran presentes.

Luego, se extrajo la suspensión de la ampolla con una pipeta Pasteur, y se colocó una gota de esta suspensión en cuatro placas Petri, conteniendo el medio Agar Levadura Manitol (LMA); se realizó mediante estrías de las gotas de la suspensión con un asa bacteriológica estéril y luego se incubó a 28°C por 7 a 10 días. Posteriormente se evaluó el crecimiento de las cepas y la pureza de las mismas, con lo cual se realizó un cultivo puro en Agar Levadura Manitol (LMA) Este procedimiento de reactivación se realizó para cada una de las cepas liofilizadas⁵. Los cultivos rizobianos nativos fueron reactivados en Agar Levadura Manitol (LMA), de acuerdo al paso anterior.

Obtención de antígenos a partir de cultivos rizobianos nativos y cepas patrón ya reactivadas

A partir de los cultivos rizobianos nativos y cepas patrón, se realizó la siembra en frascos Roux conteniendo Agar Levadura Manitol (LMA), y se incubaron entre 28 – 30 °C por 3 a 7 días, hasta observar el crecimiento de las colonias⁶. Luego se procedió a determinar la pureza del cultivo mediante la técnica de coloración Gram².

Preparación de antígenos somáticos

Una vez determinada la pureza de los cultivos se realizó la cosecha o recolección de las colonias completamente desarrolladas en LMA, que consistió en agregar asépticamente 10 mL aproximadamente de solución salina fisiológica estéril (SSFE), irrigando completamente la superficie del medio. Esta suspensión se vertió en tubos de ensayo completamente estériles; luego, se centrifugó los tubos con suspensión de células rizobiales para eliminar cualquier antígeno soluble y flagelar, se desechó el sobrenadante y se re - suspendió nuevamente el sedimento con SSFE. Este paso se repitió tres veces, teniendo en cuenta que la última suspensión celular se ajustara aproximadamente a una concentración de 1×10^9 células/mL. Luego se procedió a transferir las suspensiones a botellas estériles, las cuales se taparon con un tapón de caucho estéril con insertada una aguja (N° 23); finalmente, se calentó la solución del antígeno, sumergiendo parte de la botella en agua hirviendo durante aproximadamente 1 hora, para eliminar cualquier antígeno flagelar restante^{2,5}.

Inmunización de los conejos.

Para el siguiente procedimiento se emplearon 14 conejos de la raza Nueva Zelanda, de los cuales 2 se emplearán como controles, los restantes para la inmunización con los cultivos rizobianos y las cepas patrones; los conejos fueron de aproximadamente 3 meses de nacido, procedentes del Instituto Nacional de Salud (INS).

Antes de la inmunización de los conejos problemas, se obtuvo sangre de uno de los conejos controles, para obtener el suero pre-inmune. Se extrajo 3-4 mL de sangre mediante punción cardiaca y se colocó en tubo de ensayo sin anticoagulante, el cual se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos. Mediante una pipeta Pasteur se removió el suero y colocó en un tubo estéril, el cual se incubó en baño María por 30 minutos a 56°C para inactivar el complemento. El suero pre-inmune se almacenó en frascos adecuados a -20°C, para ser usado como control negativo⁷.

Para la inmunización del conejo se preparó una emulsión de 2 mL de antígeno con 2 mL de adyuvante completo de Freund, que se mezclaron homogéneamente hasta llegar una consistencia adecuada, la cual se inoculó vía intramuscular en la pata posterior del conejo². Después de 2 y 4 semanas se inoculó nuevamente el antígeno con adyuvante incompleto de Freund, para reforzar la respuesta inmunológica⁷.

Determinación de títulos de anticuerpos anti-rizobios.

Aproximadamente a una semana después de la última inoculación, se realizaron diversas pruebas para determinar la formación de anticuerpos, las cuales consistieron:

En primer lugar, se extrajo sangre a los conejos a través de la vena marginal de la oreja aproximadamente de 1-2 mL., las cuales se centrifugaron a 2000rpm por 15 minutos (bajo refrigeración si fuera posible). Se colectó el suero inmune en tubos estériles para la posterior determinación cualitativa de anticuerpos anti-rizobianos². Una vez determinada cualitativamente la presencia de anticuerpos anti-rizobios, se procedió a extraer 30 a 50 mL de sangre de cada conejo mediante punción cardiaca, la cual se

colectó en recipientes adecuados y se centrifugó a 2000 rpm por 15 minutos. Luego, se transfirió el sobrenadante a recipientes adecuados, una parte se empleó en la determinación del título de anticuerpos y el resto se procedió a refrigerarlo hasta su posterior empleo en pruebas de competitividad; para la determinación del título de anticuerpos anti rizobianos producidos en cada uno de los conejos, se utilizó la técnica de aglutinación en tubo².

Conservación de los anticuerpos.

Los anticuerpos purificados fueron almacenados en pequeñas alícuotas de 100 – 500 µl, previamente se agregó azida sódica a una concentración 0.02 % (W/V), para evitar la contaminación microbiana. A continuación las alícuotas se almacenaron en un congelador a -20°C, se evitaron los cambios bruscos de temperatura.

Análisis de datos

Los datos obtenidos se presentan en tablas y/o gráficos determinando el título más alto de anticuerpos producido en el conejo inmunizado con el cultivo rizobiano y/o cepa patrón.

RESULTADOS

En la evaluación de los títulos de anticuerpos anti-rizobios obtenidos al inmunizar conejos con antígenos de cepas patrón y cultivos nativos de rizobios se encontró que el menor título se obtuvo al inmunizar con el cultivo nativo Rf 167 - 02 (640) y el mayor título se obtuvo al inmunizar con *Bradyrhizobium* sp (1890), se observa también que los sueros inmunes de cuatro de las siete cepas rizobianas empleadas presentaron un título de anticuerpo contra rizobios de 1280 (Tablas 1 y 2)

Tabla 1. Titulo promedio de anticuerpos obtenidos en *O. cuniculus* inmunizados con cepas patrón de Rizobios *Bradyrhizobium* sp CIAT 71, *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Rhizobium etli* CIAT 632.

CEPAS RIZOBIANOS PATRON	<i>Bradyrhizobium</i> sp CIAT 71	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	<i>Rhizobium etli</i> CIAT 632
TITULO DE ANTICUERPOS	1280	960	1280

Tabla 2. Titulo promedio de anticuerpos obtenidos en *O. cuniculus* inmunizados con cultivos nativos de *Bradyrhizobium* sp. RC-455-02, *Rhizobium* sp. Rf 167-01, Rf 167 - 02 y Rc 458-01.

CULTIVO RIZOBIANOS NATIVOS	<i>Bradyrhizobium</i> sp. RC-455-02	<i>Rhizobium</i> sp. Rf 167-01	Rf 167 - 02	Rc 458-01
TITULO DE ANTICUERPOS	1890	1280	640	1280

DISCUSIÓN

Uno de los aspectos más importantes en el empleo de un método de inmunización para la obtención de anticuerpos específicos es la calidad inmunogénica del antígeno, es decir que estimule la producción de una mayor cantidad de anticuerpos durante un periodo más prolongado (Blanco et al; 2008), producir el reclutamiento y activación de células accesorias y la inducción de coestimuladores que permitan una respuesta inmune rápida y fuerte⁸, asimismo, lograr

disminuir la manipulación innecesaria de los animales de experimentación, porque de esta manera se evita algún tipo de traumatismo en estos.

Las cepas en estudio han sido seleccionadas en base a que poseen una caracterización morfológica, genética, etc., ya determinada; además de conocerse internacionalmente por su elevada capacidad de competencia y eficiencia en la fijación del nitrógeno; lo que permite realizar estudios en ecosistemas sometidos a diversas condiciones ambientales. Una de estas cepas es *Rhizobium tropici* (CIAT 899), caracterizada por presentar una elevada tolerancia intrínseca a la acidez, además por ser capaz de nodular diversas leguminosas, tales como *Leucaena*, *Phaseolus*, y *Macroptilium*, presenta una amplia gama de huéspedes⁹.

Por lo mencionado anteriormente, se puede afirmar que el empleo del adyuvante de Freund completo e incompleto junto con el antígeno es un buen método de inmunización que permite obtener un buen título de anticuerpos, aun cuando tiene una acción irritante en el sitio de inoculación y que generalmente producen granulomas y abscesos, ha sido demostrado que mediante el empleo de adyuvante de Freund se logra mantener hasta 180 días, niveles de anticuerpos similares a los obtenidos a los 30 días post inoculación o inmunización¹⁰.

El adyuvante completo de Freund consiste en una solución de aceite mineral de baja especificidad y viscosidad con una suspensión de *Mycobacterium* muertos por, en cambio el adyuvante de incompleto de Freund contiene únicamente el aceite mineral^{11,12}. La acción conjunta de estos adyuvantes permite la liberación más lenta del antígeno al localizarlo en el sitio de inoculación (Blanco et al; 2008) pues al solubilizarlo el antígeno se van a liberar lentamente, permiten la reclusión de células inmunocompetentes en la zona de inoculación.

En relación a las cepas de rizobios estas han sido seleccionadas porque poseen una caracterización ya determinada en base a su elevada capacidad de competencia y eficacia en la fijación del nitrógeno, tanto las cepas patrón como las cepas nativas. Por lo tanto, el presente trabajo cobra importancia ya que los niveles de anticuerpos específicos obtenidos, van a permitir realizar estudios de las características moleculares y funcionales de estas bacterias, así como también permite desarrollar un método de inmunización en el que se emplee un adyuvante que tenga elevada eficacia, una fácil manipulación, disponibilidad comercial y costo no muy elevado. Por otro lado, es necesario la optimización de un método de inmunización que permita obtener el mayor título de anticuerpos contra cepas patrón de rizobios, y que permita utilizar estos anticuerpos frente a cultivos nativos de forma que se puede a realizar en futuros estudios de serogrupos o determinación de la competitividad entre rizobios presentes en el suelo.

CONCLUSIONES

- Las cepas rizobianas patrón *Brady-rhizobium* sp. CIAT71, *Rhizobium tropici* CIAT899 y CIAT 632, así como contra cultivos rizobianos nativos *Bradyrhizobium* sp. nativo RC-455-02, *Rhizobium* sp. Rf167-01, Rf167-02 y Rc 458-01, inducen la formación de anticuerpos.
- La mayoría de sueros hiperinmunes presentaba un título de anticuerpo de 1280 contra las diferentes cepas rizobianas empleadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Burdman S, Vedder D, German M, Itzigsohn R, et al. Legume crop yield promotion by inoculation with *Azospirillum*. In: C Elmerick, A Kondorsi & WE Newton (eds.), Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. USA: Elseviere 1998; pp.609-612
2. Somesagaran P, Hoben HJ. Methods in legume Rhizobium technology. University of Hawaii, NifTAL Project and MIRSEN. 1994.
3. Sánchez-Yáñez J M. Producción de inoculantes para leguminosas y gramíneas. Coordinación de la Investigación Científica. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Proyecto 2.7. Reporte técnico. 1997.

4. Laguerre G, Mazurier S, Amarger S. Plasmid profiles and restrictionfragment polymorphism *Rhizobium leguminosarum* v. *viciae* in field populations. FEMS Microbiol Ecol 1992; 101: 17-26.
5. CIAT. Simbiosis leguminosa-Rizobio. Manual de Métodos de evaluación, Selección y manejo agronómico. Colombia. 1988.
6. Hungria M. Phenotypic grouping of Brazilian Bradyrhizobium strains which nodulate soybean. Biol Fertil Soils 1997; 25: 407-415
7. Arce M, Yolanda A, Rosas L. Prácticas de inmunología general aplicada y veterinaria. México: Manual Moderno S.A; 2007.
8. Martínez C. Modulación de la respuesta inmune. Tendencias actuales. Rev Cubana Invest Biomed 2006; 25(4): 18-23.
9. Manyani H, Sousa C, Díaz MES, Gil-Serrano A, Megías M. Leguminosae nodulation in some crops. Can J Microbiol 2001; 47(6): 574-579
10. Blanco A, Cambronero R. Adyuvantes vacunales. Bases a la respuesta inmunitaria a las vacunas. Madrid. 2008.
11. Pareja E. Antígenos e Inmunología. Universidad de Granada-España. 1999.
12. Morris H, Martínez C, Abdala D, Campos D. Adyuvantes inmunológicos. Rev Cubana Invest Biomed 1999; 18(2): 26-30.



Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* en la supervivencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Salmonella paratyphi* y *Salmonella enteritidis* en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada

Effect of *Origanum vulgare* essential oil on survival of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Salmonella paratyphi* and *Salmonella enteritidis* in pasteurized and refrigerated meat pork

Pedro Alvarado Salinas, María Vásquez Valles, Icela Rodríguez Haro, Wilton Saldaña Sevilla, Wilson Reyes Lázaro y Araceli Vargas Huamán
Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú

RESUMEN

La protección de alimentos de microorganismos patógenos se hace mayormente con sustancias químicas, muchas de ellas de elevada toxicidad y dañinas para el medio ambiente, ante ello se está investigando sustancias de origen natural que tengan la misma actividad. En la presente investigación se determinó el efecto del aceite esencial del orégano, *Origanum vulgare* (AEOV), en la supervivencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* y *Salmonella enteritidis* en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada con la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del AEOV para cada una de las bacterias en estudio. El vegetal procedió de la zona de San Ignacio Provincia de Otuzco (La Libertad, Perú) y el aceite esencial se obtuvo mediante el método de Destilación directa por arrastre con vapor de agua; posteriormente, se determinó la CMI mediante el método de Macrodilución en caldo nutritivo más Tween 80 al 0.1% para cada microorganismo. Las CMI fueron: para *S. typhi*, 3.0 µL/mL; *S. enteritidis*, 1.7 µL/mL; *S. paratyphi* A, 2.3 µL/mL y *S. aureus*, 1.5 µL/mL. Cada una de las CMI se inocularon en sistemas de ensayo conteniendo 10 g carne de porcino molida y pasteurizada a 80°C±1°C durante 30 minutos y 1 mL de suspensión bacteriana y se llevaron a refrigeración a 8°C±1°C durante 192 horas, al término de los cuales se realizó la medición del crecimiento microbiano mediante la técnica de recuento en placa en Agar Müller Hinton. Se concluye que: (i) las CMI del AEOV afectan la supervivencia de *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. paratyphi* A y *S. aureus*, (ii) AEOV que suplementa a la carne molida de cerdo afecta de manera diferente la supervivencia de las especies de bacterias probadas y (iii) AEOV que suplementa a la carne molida de cerdo afecta en mayor medida a *S. aureus* y en menor medida a *S. typhi*.

Palabras clave: Supervivencia, *Origanum vulgare*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, concentración inhibitoria mínima

ABSTRACT

Protecting food pathogens is mostly with chemicals, many of them highly toxic and harmful to the environment, before it is being investigated naturally occurring substances that have the same activity. In the present investigation the effect of the essential oil of oregano, *Origanum vulgare* (AEOV), on the survival of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* and *Salmonella enteritidis* was determined in pasteurized pork meat and chilled with the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) the AEOV for each of the bacteria studied. The plant came from the San Ignacio Otuzco province (La Libertad, Peru) and the essential oil was obtained by the method of

direct distillation by steam stripping; subsequently, the MIC was determined by the method in nutrient broth macrodilution most 0.1% Tween 80 for each microorganism. The MICs were: for *S. typhi*, 3.0 uL/mL; *S. enteritidis*, 1.7 uL/mL; *S. paratyphi A*, 2.3 uL/mL and *S. aureus*, 1.5 uL/mL. CMI each inoculated test systems containing 10 g ground beef and pork pasteurized at 80 °C ± 1 °C for 30 minutes and 1 ml of bacterial suspension and cooling took 8 °C ± 1 °C for 192 hours, after which the measurement of microbial growth was performed by the counting technique Muler Hinton Agar plate. We conclude that: (i) the MIC of AEOV affect the survival of *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. paratyphi A* and *S. aureus*, (ii) that supplements AEOV ground pork differently affect survival species of bacteria tested and (iii) that supplements AEOV ground pork affects more to *S. aureus* and to a lesser extent *S. typhi*.

Keywords: survival, *Origanum vulgare*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, Minimum Inhibitory Concentration

INTRODUCCIÓN

La conservación de los alimentos ha experimentado un cambio complejo debido a una continua búsqueda de nuevos alimentos con una vida media estable larga y alta protección contra la actividad microbiana, es decir, alimentos naturales caracterizados por estar libres o poseer bajos niveles de aditivos químicos, bajo impacto sobre el medio ambiente e inocuos; esto ha impulsado a la búsqueda de componentes antimicrobianos naturales para reemplazar a los químicos convencionales^{1,2}.

Más de 1340 plantas son conocidas como fuentes potenciales de compuestos antimicrobianos; sin embargo, pocos de ellos han sido estudiados científicamente³. Los extractos de estas plantas han sido considerados como antibacterianos naturales de alimentos y pueden ser usados como métodos adicionales para el control del crecimiento y supervivencia de microorganismos alteradores y patógenos^{4,5,6,7}.

El ajo, la cebolla, la menta, el anís, la albahaca, el cilantro, la canela, y el orégano han sido usados primeramente como flavorizantes y posteriormente reconocidos por su potencial antimicrobiano⁸. Dentro de ellas destaca el orégano por su uso como antiespasmódico, antifúngico, anticoccidial y antibacteriano, gracias a la presencia en sus hojas de p-cimeno y los derivados fenólicos carvacrol y timol^{6,9}.

Al mismo tiempo, géneros como *Salmonella* y *Staphylococcus* pueden contaminar los alimentos y ser agentes causales de enfermedad. Las salmonelas son reconocidas como las principales responsables de casos y brotes de infecciones alimentarias debido, entre otras razones, a las malas prácticas intensivas en producción animal y a la globalización del comercio de alimentos^{10,11}. Los serotipos más importantes desde el punto de vista de la Salud Pública son *S. enteritidis* y *S. typhimurium*, que se adquieren por consumo de huevos y de carne de vacuno y porcino, respectivamente¹⁰. En Brasil, se observó que una de las fuentes de contaminación de *S. entérica* más significativa en una granja porcina eran los corrales de mantenimiento; en los EEUU se examinaron 8066 muestras y se detectaron salmonelas en 83 cerdos, 54 en suelos de los corrales, 32 en las botas de los operarios, 16 en moscas, 9 en ratones, 3 en gatos y 9 en pájaros¹².

Staphylococcus aureus, por su parte, es vehiculizado especialmente por productos cárnicos y debe su patogenicidad a la producción de diversas exoenzimas tales como la coagulasa, hemolisina, proteasa, lipasa y enterotoxina, en un rango de temperatura de 7 a 48°C¹³. La intoxicación producida por esta bacteria es una de las más ampliamente distribuidas y constituye un considerable problema social, en términos de estancia en los hospitales, pérdida de días de trabajo y productividad, conjuntamente con el costo de la disposición del alimento contaminado¹⁴.

Se ha investigado el uso de químicos tales como el sorbato de potasio, sorbato y antioxidantes en combinación con otros químicos como inhibidores del crecimiento de *S. aureus*; sin embargo, los consumidores a nivel mundial se han sensibilizado a la no presencia de químicos en los alimentos, de modo que los científicos y tecnólogos alimentarios, tienen gran interés en el uso de sustancias inhibitorias naturales para prevenir el crecimiento de organismos productores de toxinas en los alimentos¹⁵.

Desde el punto de vista microbiológico el contenido en agua de la carne es alto y su aw de 0,99 lo que favorece el crecimiento de microorganismos como *Salmonella* y *Staphylococcus*, los cuales al satisfacer

sus necesidades nutritivas, modifican la composición de la carne y pueden ser fuente de enfermedad para los consumidores^{16,17}.

Investigaciones sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de mostaza, clavo, menta y canela han demostrado ser activos contra bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, levaduras y mohos^{2,5}. En el mismo sentido, se encontró que el aceite esencial del orégano, posee efecto antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* y sobre bacterias Gram negativas, a la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue de 1.56%^{18,19}, gracias a que contiene limonene, el gamma-cariofilene, rho-cymenene, alcanfor, linalol. Alpha-pinene, carvacrol y thymol^{2,20}.

Teniendo en cuenta que: (i) la carne de cerdo es muy usada en la preparación de diferentes platos y que sirve como materia prima para la preparación de derivados cárnicos, principalmente embutidos, por lo que son susceptibles de contaminarse por patógenos como *Salmonella* y *Staphylococcus*, (ii) las carnes procesadas tienen conservadores químicos pero que es preferible que los tengan naturales que les provean de sabores y olores deseados y (iii) el orégano presenta comprobadas actividades antimicrobianas²¹ es que se realizó la presente investigación que tuvo como objetivo determinar el efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* en la supervivencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Salmonella paratyphi* y *Salmonella enteritidis* en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

- a. Cultivos de:
 - *S. aureus* coagulasa positivo aislado en el laboratorio de Microbiología y Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional de Trujillo (LAMTAUNT), Trujillo, Perú, a partir de embutido.
 - *S. thypi*, *S. enteritidis*, proporcionado por el Laboratorio Referencial del Hospital Belén de Trujillo
 - *Salmonella paratyphi* A proporcionado por el Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.
- b. Hojas de *Origanum vulgare*, procedentes de la zona de San Ignacio Provincia de Otuzco Departamento de La Libertad (Perú).
- c. Carne de cerdo fresca parte pierna, obtenida en el mercado de Monserrate de la ciudad de Trujillo, proveniente del Camal Municipal del Distrito el Porvenir.

Recolección y transporte de las hojas de *Origanum vulgare*.

Las plantas de orégano fueron recolectadas intactas y adecuadas en tablas de material botánico para su transporte al Herbario Truxillense para su identificación y luego al Laboratorio de Química Física de la Facultad de Química de la Universidad Nacional de Trujillo para su procesamiento.

Extracción del aceite esencial:

Se utilizó el Método de Destilación directa por arrastre con vapor de agua, cuyos pasos fundamentales fueron:

- Las plantas de orégano fueron lavadas con agua destilada y secadas en la estufa a 60°C por 2 días, posteriormente se eliminaron los tallos.
- Las hojas secas fueron trituradas hasta obtener partículas de menor tamaño.
- El orégano fue puesto en un balón de destilación de 3 L de capacidad el cual estuvo conectado a un generador de vapor consistente en un balón conteniendo 2 litros de agua .
- Se calentó el generador de vapor de tal forma que el vapor pasó a través de la muestra y del condensador por 2 horas.
- Se colectó la fracción acuosa y el aceite esencial en una pera de decantación.
- Se eliminó la fracción acuosa de la pera de decantación y se recolectó el aceite en un vial estéril de color ámbar.
- Se deshidrató el aceite de orégano con cloruro de calcio y se almacenó para su conservación en refrigeración a temperatura de 8±1 °C, hasta su posterior utilización.

Preparación y estandarización del inóculo de los microorganismos en estudio

Cada uno de los cuatro cultivos a ensayar se sembraron en agar nutritivo y se incubaron durante 18 horas a 37°C. A partir de los cultivos se realizó una suspensión bacteriana hasta obtener una turbidez semejante al tubo N° 1 del Nefelómetro de Mac Farland (3×10^8 UFC/mL). Esta suspensión se denominó inóculo.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI):

Se determinó mediante el Método de macrodilución en caldo. Se prepararon tubos con un volumen final de 5 mL de caldo nutritivo más Tween 80 al 0.1% (V/V) a los que se les adicionó el volumen necesario de aceite de orégano hasta alcanzar las concentraciones de 0.00 (control), 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3.....2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5 μ L/mL en cada tubo. A cada uno de los tubos del ensayo se les adicionó una alícuota de 20 μ L de la suspensión bacteriana semejante al tubo N° 1 del Nefelómetro de Mac Farland y se homogenizó suavemente. Se llevó a incubación a 37°C por 48 horas. A partir de los tubos que no presentaron desarrollo visible se sembró mediante la técnica por incorporación, 1 mL en agar Müller Hinton. Se consideró como CMI aquel tubo de menor concentración donde no hubo desarrollo bacteriano en las placas sembradas. Se realizó un tubo control para cada una de las bacterias ensayadas con tween 80 al 0.1%. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Sistema de ensayo con carne de porcino molida.

- Se molió la carne de cerdo en una máquina moledora, se transfirió 10 g de carne molida a cada uno de los 32 frascos de vidrio estériles.
- Cada uno de los frascos se pasterizó a 80°C por 30 minutos. Posteriormente se adicionó el aceite esencial de orégano a las CMB establecidas para cada microorganismo.
- Todos los frascos se inocularon con 1 mL de la suspensión bacteriana correspondiente al tubo N°1 del Nefelómetro de Mc Farland y se homogenizaron.
- Cada uno de los sistemas de ensayo se almacenaron a refrigeración a $8^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ y se procesaron a partir de las 0 horas cada 24 horas hasta un periodo de 192 horas.
- Se realizó un control con carne molida y orégano a las concentraciones indicadas y 1 mL de agua lo cual constituyó el control de la pasteurización
- Todos los ensayos se realizaron por triplicado

Medición del crecimiento bacteriano del sistema de carne de porcino molida.

A los frascos de vidrio conteniendo 10 g de carne de cerdo molida, *O. vulgare* y el cultivo bacteriano respectivo, se les adicionó 90 mL de SSFE mas Tween 80 al 0.1%, la cual constituyó la primera dilución (10^{-1}). Se dejó reposar por 5 minutos. Posteriormente se realizaron diluciones consecutivas con cada una de las bacterias en estudio, de acuerdo al siguiente esquema:

MICROORGANISMO	TIEMPO (hs)	DILUCIONES
<i>Salmonella paratiphy A</i>	0	10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}
	24	10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}
	48	10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}
	72	10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} ,
	96	10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ,
	120	10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}
	144	10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}
	168	10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}
	192	10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}

Las dos últimas diluciones de cada sistema se sembraron por incorporación en Agar Müller Hinton y se incubaron a 37°C por 24 horas. Cada una de las concentraciones de orégano determinadas como CMI, para cada microorganismo ensayado si hicieron de acuerdo al mismo procedimiento. Los resultados fueron expresados en log UFC/g de carne. Todos los sistemas ensayados se realizaron por triplicado.

Análisis de los resultados

Los datos obtenidos de los recuentos de todos los sistemas y cultivos microbianos procesados fueron sometidos a la prueba de varianza Unidireccional (ANOVA) seguida por la prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas de cada sistema experimental en relación al grupo control.

RESULTADOS

Se encontró que la menor CMI para los diferentes microbios estudiados (*S. paratyphi* A, *S. typhi*, *S. enteritidis*, *Staphylococcus aureus*) fue de 1.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y la mayor de 3.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de medio de cultivo (Tabla 1).

Respecto de la curva de supervivencia de los microorganismos en carne molida de cerdo a CMI variables y a tiempos también variables se apreció que hay una disminución significativa del número de microorganismos inoculados (Figs. 1, 2, 3 y 4); en cambio en todos después de las 144 hs los microorganismos se mantienen constantes (Fig. 5).

Tabla 1. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre cuatro especies de bacterias

Especie de bacteria	CMI $\mu\text{L}/\text{mL}$
<i>Salmonella paratyphi</i> A	2.3
<i>Salmonella typhi</i>	3.0
<i>Salmonella enteritidis</i>	1.7
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.5

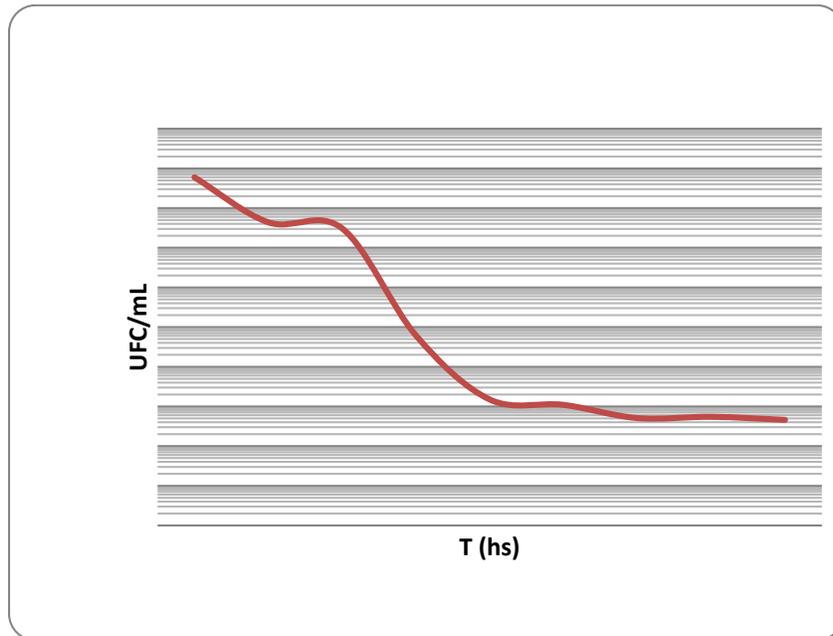


Fig. 1. Curva de supervivencia de *Salmonella Typhi* de 0 hs a 192 hs en carne de cerdo suplementada con aceite esencial de *Origanum vulgare* a una CMI de 3.0 $\mu\text{L}/\text{g}$

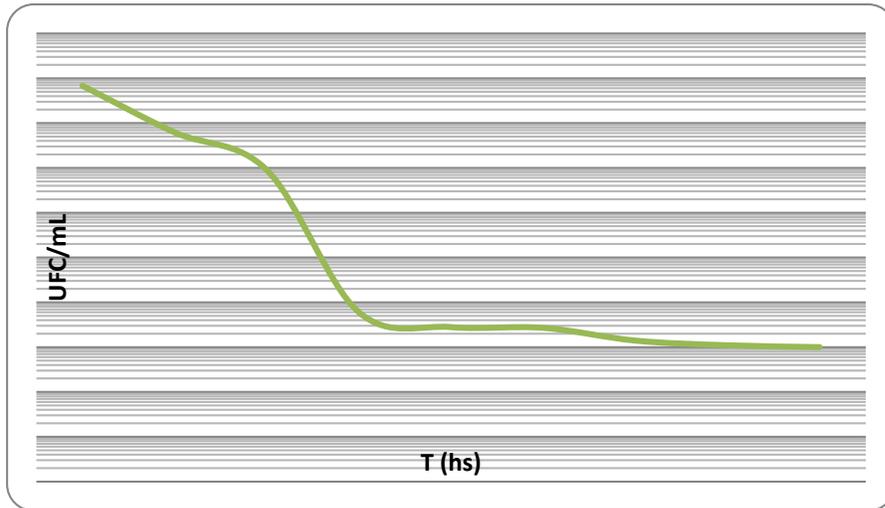


Fig. 2. Curva de supervivencia de *Salmonella paratyphi* A de 0 hs a 192 hs en carne de cerdo suplementado con aceite esencial de *Origanum vulgare* a una CMI de 2.3 μ L/g

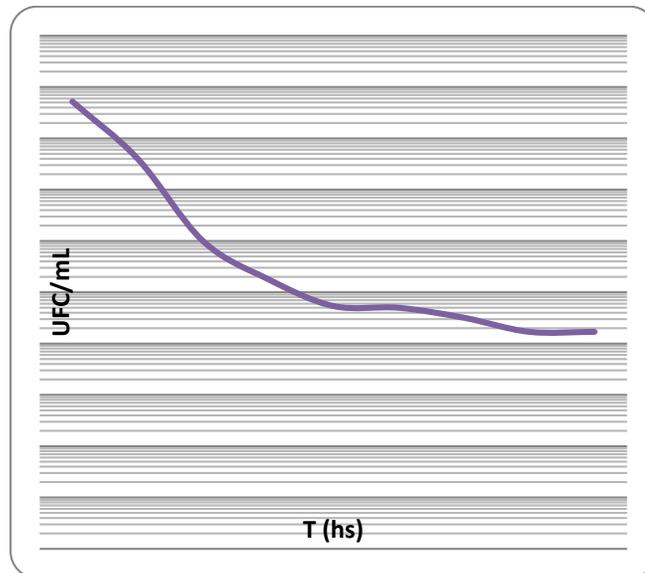


Fig. 3. Curva de supervivencia de *Salmonella enteritidis* de 0 hs a 192 hs en carne de cerdo suplementada con aceite esencial de *Origanum vulgare* a una CMI de 1.7 μ L/g

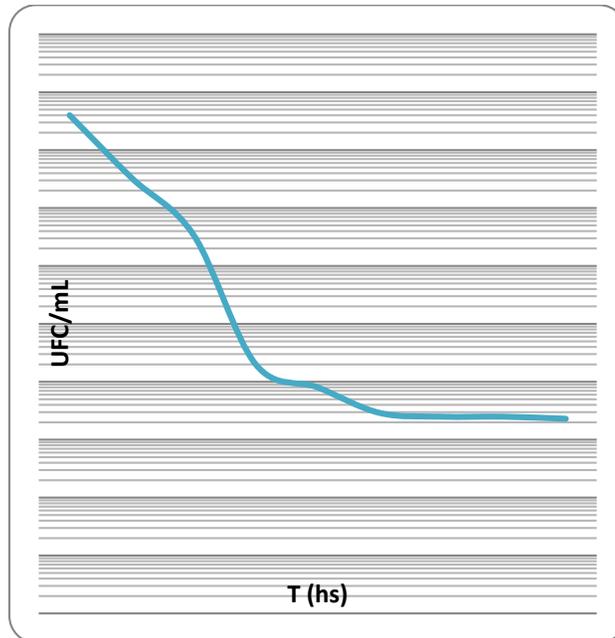


Fig. 4. Curva de supervivencia de *Staphylococcus aureus* de 0 hs a 192 hs en carne de cerdo suplementado con aceite esencial de *Origanum vulgare* a una CMI de 1.5 µL/g

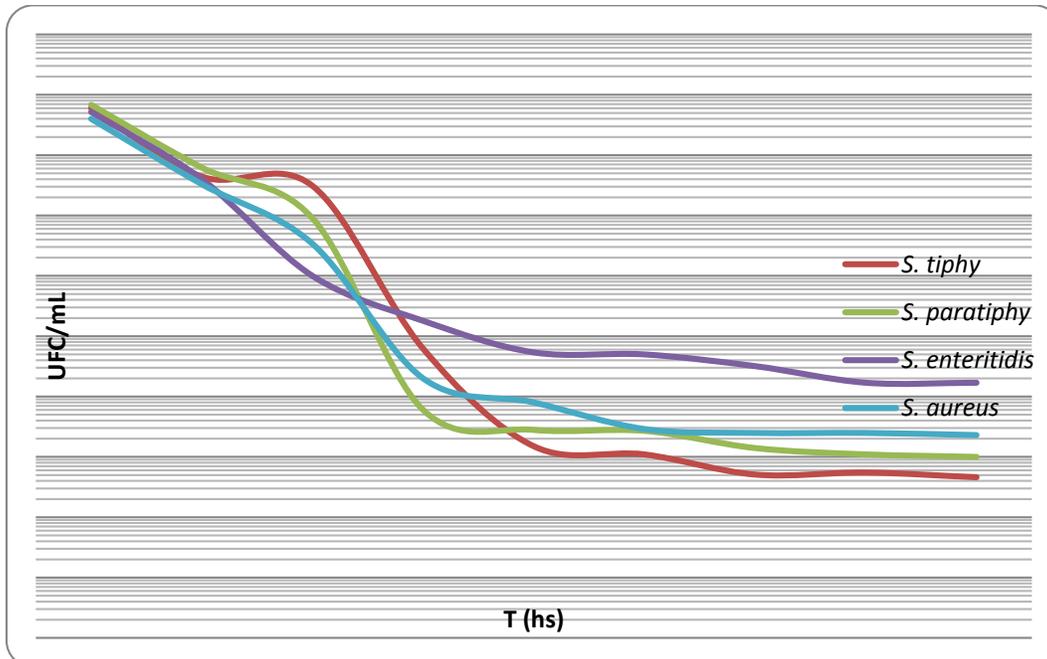


Fig. 5. Curvas de supervivencia de *S. typhi* (CMI: 3.0 µL/g), *S. paratyphi A* (CMI: 2.3 µL/g), *S. enteritidis* (CMI: 1.7 µL/g), *Staphylococcus aureus* (CMI: 3.0 µL/g) de 0 a 192 hs en carne de cerdo suplementado con aceite esencial de *Origanum vulgare*

DISCUSIÓN

El orégano, ha sido una fuente invaluable de productos naturales para mantener la salud humana por un largo periodo de tiempo. Especialmente en la última década con estudios intensivos para terapias naturales. Como planta medicinal, el aceite volátil de orégano ha sido usado como antifúngico, antiespasmolítico y antimicrobiano⁹.

La coexistencia de *S. aureus*- *Salmonella*, en alimentos vinculados a ETA, se explica por la naturaleza de los alimentos, en su mayoría de origen animal, lo que justifica la presencia de ambos microbios, fundamentalmente de la enterobacteria; por otro lado, la presencia de dichos microbios, se debe a errores en la manipulación y conservación de los alimentos, aspecto comprobado en otras investigaciones^{22,23,24}.

A pesar de que en la actualidad se ha mejorado la higiene y las técnicas de producción de alimentos, la seguridad alimentaria es un importante problema de salud pública. Se ha estimado que cerca del 30% de personas en países industrializados, cada año sufren de enfermedades transmitidas por alimentos y, en el 2000, al menos 2 millones de personas murieron de enfermedades diarreicas en todo el mundo²⁵.

S. aureus, agente causal de intoxicación alimentaria cuando crece sobre alimentos frescos, cocidos o inadecuadamente almacenados, prevalece tanto en países desarrollados como en aquellos en vía de desarrollo. En países tropicales en desarrollo, este problema puede ser aún más crítico debido a que la carne fresca, otros productos animales y, alimentos preparados, son vendidos en mercados abiertos donde ellos están expuestos a un ambiente que conduce a la contaminación. En esas regiones, la refrigeración no es fácilmente disponible para los grupos económicos más bajos de modo que, los alimentos preparados, se dejan en lugares tibios por horas y aún días. Esto ocurre tanto en las casas como en tiendas y otros sitios de venta, aún en países altamente desarrollados del mundo. La intoxicación alimentaria por *Staphylococcus*, puede ocurrir debido a que el alimento preparado fue dejado sin refrigeración por un periodo largo antes de su consumo. Esto puede ocurrir en bufets, recepciones matrimoniales y otras festividades grupales. Alimentos como sándwiches, piernas, otras carnes, etc, son ricos en sustancias nutritivas y, siendo apropiada la temperatura a la cual se encuentran, ayudaría rápidamente al crecimiento y consecuentemente a la producción de la toxina estafilocócica¹⁵.

La efectividad de los agentes antibacterianos como el aceite esencial de orégano sobre microorganismos diana, son obtenidas a partir de la concentración Mínima Inhibitoria (CMI). La CMI mide el desempeño antibacteriano del agente, a través de la más baja concentración de una droga que previene el crecimiento de un patógeno particular. La CMB es la concentración más baja que mata al patógeno²⁶.

La menor CMI para los diferentes microbios estudiados fue de 1.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para *S. aureus* y la mayor de 3.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para *S. typhi*; con lo cual estadísticamente se observa una diferencia significativa entre la CMI de *S. typhi* (3.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y *S. enteritidis* (1.7 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Este resultado es interesante porque, a pesar de ser el mismo género bacteriano, se observa que *S. typhi* presenta mayor resistencia al aceite esencial de orégano por lo cual necesita mayores dosis del agente antibacteriano para inhibir su crecimiento. La acción inhibitoria encontrada, concuerda con lo hallado en investigaciones con *S. enteritidis* y aceite esencial de orégano encontraron CMI de 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$, y CMI para *St. aureus* de 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de medio de cultivo². El aceite esencial de orégano al actuar como antibacteriano afecta la permeabilidad de la membrana bacteriana causando un flujo de salida de iones desde el interior de la célula hacia el exterior. La salida de iones es usualmente acompañada con otros constituyentes citoplasmáticos, y hasta una cierta cantidad de pérdida puede ser tolerada por la célula bacteriana sin perder la viabilidad, pero si el flujo de salida es muy prolongado, causaría el colapso de la célula²⁷.

Se puede decir que la actividad antimicrobiana del aceite esencial del orégano se relaciona con la composición de sus constituyentes, así, la composición del orégano en forma porcentual es: carvacrol 80%, thymol 64% γ -terpinenene 2-52% y p-cymene 82% ya que dicha composición puede variar en función del grupo funcional y las posibles acciones sinérgicas entre sus componentes²; por ejemplo, cuando se probó contra *S. aureus* y usando la técnica de difusión en agar se encontró un halo de 17.6

mm, mientras que enfrentándolo con uno de sus componentes, el carvacrol, encuentra un halo de inhibición de crecimiento de 11.3 mm, lo que significaría que este componente de manera aislada no tiene mucha actividad antibacteriana que estando en el aceite en forma sinérgica con el resto de componentes⁸.

Cuando se estudió el efecto antibacteriano del orégano contra bacilos Gram negativos y evaluándolos mediante la técnica de difusión en agar se encontró la CMI para *S. typhi* de 22.4 μmL^{-1} y de 12 μmL^{-1} para *S. paratyphi* B²⁸; en tanto que cuando se trabajó con un inóculo de 1×10^6 microorganismos/mL y adicionando 10 μL de aceite de *O. vulgare* encuentra halos de inhibición de crecimiento de 32 mm para *S. aureus* y de 11mm para *Salmonella*²⁹. A pesar de ser dos técnicas diferentes, lo encontrado en el presente trabajo guarda relación con la CMI para *S. typhi* y *S. paratyphi* A por ser serotipos muy relacionados.

La supervivencia de *S. enteritidis* en carne molida de cerdo a CMI de 1.7 $\mu\text{L/g}$ con disminución significativa del número de microorganismos inoculados hasta las 96 hs y a partir de ésta el número de células se mantiene, estaría relacionado con el hecho de que los microorganismos como *S. enteritidis* al estar en un sistema con otros componentes como es la carne de cerdo puede interferir en la acción antibacteriana y crear mayor resistencia a la acción del aceite¹¹. Lo mismo se apreció en la supervivencia de *S. aureus* en carne de cerdo molida y pasteurizada en la que se tiene una CMI de 1.5 $\mu\text{L/g}$ que es la más baja CMI encontrada, observándose que, hasta las 96 hs, hay una disminución significativa del número de microorganismos inoculados y hasta las 192 hs se mantiene constante, podría deberse a que cada aceite esencial tiene un diferente comportamiento al actuar sobre un microorganismo diana.

Por su parte, la curva de supervivencia de *S. aureus*, *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. paratyphi* A en carne molida de cerdo a diferentes CMI de aceite esencial de orégano, observándose que en todos después de las 144 hs los microorganismos se mantienen constantes, podría significar que el aceite solo es un agente bacteriostático; sin embargo, se ha reportado que las propiedades antimicrobianas pueden variar dentro de una misma especie de planta, debido a su composición química y proporciones relativas de los constituyentes individuales en los aceites esenciales de las plantas son por el genotipo, estado de crecimiento, clima, y localización geográfica²⁹, estación, periodo de cosecha y técnica de destilación (Baydar *et al*, 2004). La actividad antibacteriana depende del tipo, concentración de la especia o el aceite esencial, el tipo y concentración del microorganismo blanco, la composición del sustrato, el procesamiento y las condiciones de almacenamiento².

Investigadores han adaptado métodos experimentales para representar lo mejor posible futuras aplicaciones, sin embargo el ensayo puede ser afectado por múltiples factores tales como: el método para extraer el material de la planta, el volumen de inóculo, la fase de crecimiento, el medio de cultivo, el pH, el emulsificante, el tiempo y la temperatura de incubación (Bruneton, 1999), es por eso que en numerosas investigaciones realizadas con el aceite esencial de *O. vulgare* se reportan diferentes hallazgos relacionados con la actividad antibacteriana del aceite. Es así que se han reportado la actividad del extracto etanólico de *Eleutherine americana* sobre *S. aureus* usando la técnica de difusión en agar obteniendo zonas de inhibición de 14.5 y 15.7 mm¹⁴ y que cuando se trabaja con bacterias alteradoras y patógenos se detectó una MIC de 1.6 $\mu\text{L/mL}$ de aceite de orégano para *S. enteritidis*².

El uso de agentes microbiostáticos en los alimentos, induce a la aparición de variantes resistentes de los microorganismos, la cual puede deberse a: (i) desarrollo de vías metabólicas alternativas a las bloqueadas por el agente antimicrobiano, (ii) se pueden sintetizar enzimas específicos para modificar la estructura y por tanto, inactivar al agente antimicrobiano o (iii) el microorganismo puede adquirir una resistencia más elevada por modificar su estructura¹¹.

Las especias además de añadir flavor a los alimentos inhiben también el desarrollo de los microorganismos. En general, los organismos Gram positivos son más sensibles que los Gram negativos. La canela, el clavo y la mostaza están considerados como inhibidores fuertes, la pimienta negra, pimienta roja y el jengibre son inhibidores débiles para muchos microorganismos. La hoja de laurel, cilantro, cominos, orégano, romero, salvia y tomillo son inhibidores medios³⁰. El orégano en un primer momento es bactericida para posteriormente actuar como un bacteriostático, sin embargo hay que resaltar que *S. enteritidis* a la CMI del antibacteriano tiene la mayor población hasta las 192 hs y *Salmonella typhi* tiene la menor población bacteriana. La prueba estadística usada soporta estos resultados.

La acción del aceite esencial de orégano sobre la supervivencia de los microorganismos ensayados podría deberse a la inserción de carvacrol en la membrana la que conduce a una disminución del potencial de membrana, tal como se demostró al evaluar la acción del carvacrol sobre el potencial de membrana de *B. cereus* apreciándose una disminución del pool de ATP intracelular³¹; el cymene, otro constituyente del orégano tal como el carvacrol, disminuye el potencial de membrana sin embargo carece del grupo hidroxilo, se necesitan concentraciones más altas de cimeno para obtener la misma reducción que la obtenida con el carvacrol. Sin embargo, el grupo hidroxilo juega un rol importante en el efecto del carvacrol sobre el potencial de membrana. El cimeno ejerce influencia en el pH intracelular debido a que expande la membrana citoplásmica causando una baja en el potencial de membrana.

El grupo hidroxilo de la molécula del carvacrol. Las observaciones descritas soportan el siguiente modelo de la acción antimicrobiana de una característica del grupo fenol hidroxilo es su significativa mayor acidez que la del grupo alifático hidroxilo. Se ha propuesto que el carvacrol actúa como un transportador de cationes monovalentes a través de la membrana por intercambiar su protón del grupo hidroxilo por otro ión tal como el ión potasio; en efecto, el carvacrol sin disociar difunde a través de la membrana citoplásmica y en el interior libera el protón al citoplasma. Este podría entonces retornar sin disociarse transportando un ión Potasio u otro catión del citoplasma el cual es transportado a través de la membrana citoplásmica al exterior de la célula; esta hipótesis es sostenida por el flujo de salida de K⁺ y flujo de entrada del H⁺ en *B. cereus* durante la exposición al carvacrol³¹.

Todos los cultivos ensayados en el sistema con carne de porcino molida y almacenada a temperatura de refrigeración, mostraron sensibilidad moderada frente al aceite esencial de orégano ya que, a pesar de haber causado una reducción drástica de la población bacteriana, los recuentos muestran la supervivencia de los diferentes microorganismos evaluados en la carne inoculada en cantidades suficientes para causar daño al consumidor, toda vez que *Salmonella* no debe estar presente en dichos alimentos y si es que ha habido contaminación por ésta y no ha sido eliminada del alimento al aplicar la CMI encontrada para este patógeno, la carne de porcino es de alto riesgo para la salud; asimismo a la CMI encontrada para *S. aureus* y aplicada en el sistema de estudio también se encuentra sobre el límite permitido para este microorganismo en carnes de porcino molida³².

Hay que observar también que las cantidades de extractos naturales adicionadas a cada uno de los sistemas pueden darse en valores mayores a las determinadas en el presente trabajo sin embargo podrían no ser recomendables ya que causarían cambios en las características organolépticas del producto, sin lograr de cualquier manera un incremento importante en la actividad antimicrobiana²⁶.

CONCLUSIONES

- Las CMI del aceite esencial de *Origanum vulgare* afectan la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi A* y *Staphylococcus aureus*.
- El aceite esencial de *Origanum vulgare* que suplementa a la carne molida de cerdo tiene efecto inhibitorio diferente en la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi A*.
- El aceite esencial de *Origanum vulgare* que suplementa a la carne molida de cerdo, afecta en mayor medida a *Staphylococcus aureus* y en menor medida a *Salmonella typhi*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marino M, Bersani C, Comi G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiacea and Compositae. Intern J Food Microbiol 2001; 67: 187-195
2. Leite de Souza E, De Oliveira E, De Luna KR, Paiva C. Inhibitory Action of Some Essential Oils and Phytochemicals on the Growth of Various Moulds Isolated From Foods. Braz Arch Biol Technol 2005; 48: 245-250.
3. Leite de Souza E, Montenegro TL, De Oliveira E. Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. Braz J Microbiol 2006; 37(4): 151-7

4. Benkeblia N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensm.-Wiss. U.-Technol* 2004; 37: 263-268.
5. Reichling J, Schnitzler P, Suschke U, Saller R. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties- an Overview. *Forsch Komplementmed* 2009; 16: 79- 90.
6. Ravi S, Sita P, Janardhan K. Evaluation of in vitro antimicrobial activity of leaf and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC. *World J Microbial Biotechnol* 2008; 24:1909-1914.
7. Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, Salgueiro L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and species. *J Med Microbiol* 2009; 58: 1454-1462
8. Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Intern J Food Microbiol* 2007; 115: 290-296
9. Ertas ON, Guler T, Ciftci M, Dalkilic B, Simsek UG. The effect of an essential oil mix derived from Oregano, Clove and Anise on broiler performance. *Intern J Poultry Sci* 2005; 4(11): 879-884.
10. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). *Microorganismos de los Alimentos*. España: Edit Acribia S.A.
11. Mossel DAA, Moreno B, Struijk CB. *Microbiología de los alimentos*. 2da ed. España: Edit. Acribia, S.A. 2010.
12. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. *Microbiología moderna de los alimentos*. 5ta ed. España: Edit. Acribia, S.A. 2009.
13. Institute of Food Technologists. *Bacteria Associated with Foodborne Diseases*. Scientific Status Summary. 2004. http://members.ift.org/NR/rdonlyres/3DEA7A91-DF48-42CE-B195-6B01C14E2_73_0/bacteria.pdf.
14. Ifesan BOT, Hamtasin C, Mahabusarakam W, Voravuthikunchai SP. Inhibitory Effect of Eleutherine Americana Merr. Extract on *Staphylococcus aureus* isolated from food. *J Food Scie* 2009; 74(1): 76-81
15. Graham HD, Graham EJF. Inhibition of *Staphylococcus aureus* Growth and Heat-Stable Deoxyribonuclease Production by Garlic (*Allium sativum*). *Caribbean J Sci* 1998; 24(3-4): 95-101.
16. Larrañaga I, Carballo JM, Rodríguez M, Fernández J. *Control e Higiene de los Alimentos*. España: Edit Mc Graw-Hill/Interamericana de España, S.A.U. 1999.
17. Vinent N. Riesgo de enfermedades transmisibles por alimentos en el combinado cárnico de la Empresa de Producción agropecuaria. *MEDISAN* 2004; 8(1): 12-20.
18. Albado E, Saez G, Grabiell S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) *Rev Med Hered* 2001; 12(1): 16-19.
19. Solís PN. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los Aceites Esenciales de Orégano (*Origanum vulgare* L.) y Tomillo (*Thymus vulgaris* L.) como Potenciales Bioconservadores en Carne de Pollo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador. 2012.
20. Arcila CC, Loarca G, Lecona S, Gonzales E. El orégano: Propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. University of Illinois, Urbana-Champaign. www.alanrevista.org/ediciones/2004-1/oregano_propiedades_composicion_actividad_biolologica.asp
21. Bajpai VK, Rahman A, Dung NT, Huh MK, Kang SC. *In vitro* inhibition of Food Spoilage and Foodborne Pathogenic Bacteria by Essential Oil and Leaf Extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *J Food Sci* 2008; 73(6): 78-83.
22. Caballero A, Carreño M, Cárdenas T, Grave O, Peraza P. Proceso de enseñanza-aprendizaje y utilización del sistema del análisis de peligros y puntos críticos de control en alimentos. *Rev Cubana Aliment Nutr* 2002; 16(1): 35-41.
23. Caballero A, Torres M. Efectos de la capacitación de los inspectores sobre el control de la temperatura de los alimentos. *Rev Cubana Sal Pública* 2004; 30(2): 45-54.
24. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, et al. Composition and antimicrobial Activity of Essential Oils from Aromatic Plants Used in Brazil. *Braz J Microbiol* 2004; 35: 275-280.
25. Ardila MI, Vargas AF, Pérez JE, Mejía LF. Estudio preliminar de la actividad antibacteriana de extractos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. *Biosalud* 2009; 8: 121-126.
26. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. Estudio de la Concentración Mínima Inhibitoria y modo de acción del aceite esencial de orégano y modo de acción del aceite esencial de orégano, thymol y carvacrol. *J Appl Microbiol* 2001; 91: 453-462
27. Helander I, Alakomi H, Latva-Kala K, Irene T, et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram Negative bacteria. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 3590-3595.
28. Nazia A, Sabahat S, Tariq P. Antibacterial effects of oregano (*Origanum vulgare*) against gram negative bacilli. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 5986-5990.

29. Nevas M, Korhonen AR, Lindström M, Turkki P, Korkeala H. Antibacterial efficiency of Finnish Spice Essential Oils against Pathogenic and Spoilage Bacteria. *J Food Protection* 2004; 67(1): 199-202.
30. Casp A, Abril J. Tecnología de alimentos: Procesos de conservación de alimentos. 2da ed. España: Ediciones Mundi Prensa. 2003.
31. Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(4): 1561.
32. MINSA/DIGESA. Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Lima, Perú. 2008.



Trypanosoma cruzi: características del crecimiento y susceptibilidad a violeta de genciana “in vitro” de dos poblaciones nativas de Zaña, Lambayeque, Perú

Trypanosoma cruzi. in vitro ground features and susceptibility to gentian violet of two native populations from Zaña, Lambayeque, Peru

Cristian Aurazo¹, Judith Roldán² y César A. Jara²

¹Egresado de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.

²Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo

RESUMEN

En el norte peruano se ha registrado la presencia de *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas, en el vector, *Panstrongylus chinai*, y en animales sinantrópicos; sin embargo, las poblaciones nativas aún no han sido caracterizadas. En la presente investigación se determinaron las características del crecimiento y la susceptibilidad a violeta de genciana in vitro de dos poblaciones de *T. cruzi* obtenidas de *P. chinai* naturalmente infectados en Zaña, Lambayeque-Perú, denominadas arbitrariamente Tz-1 y Tz-2. De cada población se preparó una suspensión conteniendo 5×10^5 epimastigotes/mL, de la cual se inoculó 0.05 mL en tubos con el medio de cultivo bifásico BHI. Un similar inóculo se añadió a otros tubos conteniendo el mismo medio de cultivo a los que adicionó violeta de genciana a las concentraciones de 0.01ug/mL, 0.1ug/mL, 1.0ug/mL, 10.0ug/ mL y 100.0ug/mL. Se encontró un crecimiento máximo de 995000 epimastigotes/mL y 912000 epimastigotes/mL para la población Tz-1 y Tz-2, respectivamente, al 16^{to} de cultivo, así como, susceptibilidad de ambas poblaciones a las concentraciones de 10.0ug/mL y 100.0ug/mL de violeta de genciana.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, *Panstrongylus chinai*, susceptibilidad, violeta de genciana

ABSTRACT

In northern Peru has recorded the presence of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, in vector, *Panstrongylus chinai*, and synanthropic animals; however, native populations have not yet been characterized. In the present study the growth characteristics and susceptibility to gentian violet in vitro of two populations of *T. cruzi* obtained from naturally infected *P. chinai* Zaña, Lambayeque, Peru, called arbitrarily determined Tz Tz-1 and-2. Of each stock suspension containing 5×10^5 epimastigotes / mL, of which 0.05 mL was inoculated into tubes containing the BHI culture medium prepared biphasic. A similar inoculum was added to another tube containing the same culture medium to which added gentian violet 0.01ug/mL concentrations, 0.1ug/mL, 1.0ug/mL, 10.0ug / mL and 100.0ug/mL. 995000 maximum growth of epimastigotes / mL and 912000 epimastigotes / mL for Tz Tz-1 and-2 population, respectively, to the 16th of culture, as well as susceptibility to both populations 10.0ug/mL concentrations was found and 100.0 ug / mL of crystal violet.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, *Panstrongylus chinai*, susceptibility, gentian violet

INTRODUCCIÓN

Producida por el protozooario hemofalgelado *Trypanosoma cruzi* y reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las trece enfermedades tropicales más descuidadas, la enfermedad de Chagas ha sido un azote para la población humana del continente americano, principalmente en zonas rurales en donde habita el insecto vector, y sigue siendo debido a que por efectos de la globalización y al aumento de viajes de inmigrantes desde centro y Sudamérica al resto del mundo, la infección se ha difundido en USA, Canadá y Europa ^{1,2,3,4,5}. En el Perú existen aproximadamente 192 mil infectados y el 12% de la población de halla en riesgo de contraer la enfermedad, principalmente en los departamentos del sur (Arequipa, Moquegua y Tacna) en donde el vector es *Triatoma infestans* y secundariamente en algunos departamentos del norte (Cajamarca, Amazonas y Piura) en donde el vector es *Rhodnius ecuadoriensis* ^{2,6,7}.

T. cruzi pertenece a una especie heterogénea consistente en un pool de cepas, stocks o aislamientos que circulan entre mamíferos y los insectos vectores, esta heterogeneidad ha sido ampliamente estudiada mediante métodos biológicos, bioquímicos y moleculares y puede explicar la variabilidad de las manifestaciones clínicas y las variaciones geográficas en relación a la morbilidad, reconociéndose en la actualidad seis categorías de poblaciones denominadas: TcI a TcVI^{8,9}. Los métodos biológicos involucran aspectos como la morfología, infectividad, tropismo tisular, virulencia, composición antigénica, velocidad de metaciclogeñesis, crecimiento de epimastigotes en medios de cultivo y la susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos^{8,10,11}.

El crecimiento de los epimastigotas en medios de cultivo varía en relación al tiempo, medio de cultivo y número de parásitos, por ejemplo, algunas cepas de Bolivia y de Brasil presentaron picos de crecimiento de epimastigotes en medio de cultivo 3N entre los 9 y 11 días ^{10,11}, de Colombia de 30 días en medio AGAR-LIT-BHI ⁸ y poblaciones aisladas de *Panstrongylus chinai* de Chaman (La Libertad) a los 13 a 18 días en medio 3N ¹² y en sólo cinco días cuando se utilizó BHI mezclada con un extracto de maca ¹³.

Debido a los pocos antitripanosmas disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas: nifurtimox y benzimidazol, comparados con antiparasitarios para otras enfermedades^{14,15}, se ha investigado la efectividad de algunos aceites esenciales extraídos de plantas ^{16,17,18} así como sustancias químicas como el thienyl-2-nitropropeno ¹⁹, compuestos dicationicos aromáticos ²⁰ y violeta de genciana²¹.

Teniendo en cuenta la gran heterogeneidad que presenta el parásito en relación a sus características biológicas, las mismas que pueden variar entre distintas poblaciones de *T. cruzi* de diferentes áreas geográficas o dentro de una misma zona geográfica, que la presencia del parásito ha sido registrada en el valle de Zaña (Lambayeque, Perú) ²² pero que no ha sido objeto de estudios posteriores, el presente trabajo estuvo orientado a determinar las características de crecimiento y susceptibilidad a diferentes concentraciones de violeta de genciana en medio de cultivo BHI, de dos poblaciones de *T. cruzi* obtenidas de *Panstrongylus chinai* de Zaña-Lambayeque, Perú.

MATERIAL Y MÉTODOS

Poblaciones de *Trypanosoma cruzi*

Se usaron dos poblaciones nativas de *T. cruzi* denominadas arbitrariamente Tz-1 y Tz-2, obtenidas de distintos especímenes de *Panstrongylus chinai*, naturalmente infectados, capturados en el valle de Zaña, departamento de Lambayeque, Perú (6.71°LS, 79.57°LO). Los triatomíinos fueron alimentados con sangre de paloma y colocados en placas petri estériles donde defecaron y las heces fueron examinadas al microscopio invertido en busca de formas flageladas, según procedimientos utilizados previamente ^{12,13}.

Cultivo in vitro de epimastigotes de *T. cruzi* y preparación del inoculo

Los epimastigotas se obtuvieron a partir de sangre de ratones infectados previamente con cada población de *T. cruzi* (Tz-1 y Tz-2) extraída de forma estéril e inoculada, 0.1mL, en tubos con medio bifásico BHI, conteniendo una fase sólida de agar BHI suplementada con sangre de conejo y una fase líquida constituida por caldo BHI, y conservados a 28±1°C¹³.

A partir del segundo día de inoculados, se extrajo en condiciones de esterilidad con ayuda de una jeringa tuberculina 0.1mL de muestra de la fase líquida del medio para realizar un recuento en cámara de Neubauer a fin de determinar la fase logarítmica de crecimiento y a partir de ésta preparar un inoculo conteniendo 5×10^5 epimastigotes/mL^{8,12,13}, para cada población de *T. cruzi*.

Determinación de las características del crecimiento de epimastigotes

Una vez obtenido el inóculo estandarizado por cada población, se inoculó 0.05 mL de este en tubos con medio bifásico BHI (10 por cada población). A partir del segundo día hasta el día 24 postinoculación se evaluó el crecimiento extrayendo 0.1mL de la fase líquida cada 48 horas, para hacer recuento en cámara de Neubauer, manteniéndolos a temperaturas de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ^{12,13}.

Evaluación de la Susceptibilidad de las poblaciones de *T. cruzi* a violeta de genciana

Para esta evaluación se emplearon concentraciones de 0.01ug/mL, 0.1ug/mL, 1.0ug/mL, 10.0ug/mL, 100.0ug/mL de esta. Para ello las distintas concentraciones se obtuvieron añadiendo la violeta de genciana en caldo BHI estéril, preparándose inicialmente la concentración de 100.0ug/mL, y a partir de estas diluciones sucesivas para la obtención de las restantes concentraciones. Se añadió 4mL de caldo BHI conteniendo cada determinada concentración en tubos con medio agar BHI suplementado con sangre de conejo (5 tubos/concentración/población, respectivamente).

Una vez obtenido también un inóculo estandarizado de 5×10^5 epimastigotes/mL, se agregó 0.05 mL de este, en cada de los tubos con medio BHI conteniendo las distintas concentraciones de violeta de genciana. Además se tuvieron 5 tubos con medio BHI bifásico conteniendo únicamente 0.05mL del inoculo por cada población de *T. cruzi*, los cuales fueron usados como controles. Al día 16 de inoculación y habiendo alcanzado la fase de máximo crecimiento en los tubos controles; se extrajo en condiciones de esterilidad 0.1mL de todos los tubos inoculados (tanto experimentales como controles), para mediante recuento en cámara de Neubauer, determinar los siguientes valores⁹:

$$\text{Índice de crecimiento (I.C.)} = \frac{\text{Número final de parásitos}}{\text{Número inicial de parásitos}}$$

Porcentaje de crecimiento (P.C.), sólo cuando I.C. del grupo experimental es > 1 .

$$P : C. = \frac{I.C. \text{ de grupo experimental}}{I.C. \text{ de grupo control}} \times 100$$

Porcentaje de reducción del crecimiento (P.R.), sólo cuando I.C. del grupo experimental es menor a 1.

$$P.R. = 100 - \left(\frac{I.C. \text{ del grupo experimental}}{I.C. \text{ del grupo control}} \right) \times 100$$

RESULTADOS

Se encontró que la fase logarítmica de crecimiento se inició al 4^{to} día de inoculación en ambas poblaciones, alcanzando un nivel máximo de 995000 epimastigotes/mL y 912000 epimastigotes/mL, para las poblaciones Tz-1 y Tz-2, respectivamente, a los 16 días post inoculación en medio BHI (Fig. 1). Respecto de la susceptibilidad a la violeta de genciana, se encontró que ambas poblaciones presentaron susceptibilidad a las concentraciones de 10.0ug/mL y 100.0ug/mL, en el 99.9 y 100.0%, respectivamente (Tabla 1).

DISCUSIÓN

Como se sabe, *T. cruzi* metaboliza la glucosa y otros azúcares mediante la vía glicolítica en condiciones aeróbicas con excreción de ácidos orgánicos y que para ello requiere de minerales, proteínas y vitaminas presentes en el medio para su crecimiento, sobreviviendo en forma de epimastigotes a temperatura de $24-28^\circ\text{C}$, a $\text{pH } 7.0 \pm 0.2$ ^{13,17,22}. Muchos de estos elementos se encuentran en el medio de cultivo utilizado lo

que permitió obtener un adecuado crecimiento de las formas epimastigotes de ambas poblaciones, Tz-1 y Tz-2, con una concentración máxima de 995000 epimast/mL y 912000 epimast/mL, respectivamente, valores mayores a los alcanzados por Saldaña et al ¹³ quienes utilizaron el mismo medio y obtuvieron, en promedio, 155000 epimast/mL. Sin embargo con el uso de otros medios de cultivo, como el medio LIT, se han encontrado que cepas de distintos países pueden alcanzar valores de crecimiento mayores: entre 2'000,000 y 28'000,000 epimast/mL ^{8,10,15}.

Tabla 1. Susceptibilidad de epimastigotes derivadas de poblaciones Tz-1 y Tz-2 de *Trypanosoma cruzi* aisladas de *Panstrongylus chinai* de Zaña, Lambayeque, Perú, a violeta de genciana.

Violeta de genciana (ug/MI)	Población Tz-1		Población Tz-2	
	% C	% R	% C	% R
0.01	97.92	0	96.50	0
0.10	83.99	0	80.24	0
1.00	36.59	0	38.58	0
10.00	0	99.99	0	99.99
100.00	0	100.00	0	100.00

(%R)= porcentajes de reducción y (%C)= porcentajes de crecimiento, respecto a los controles.

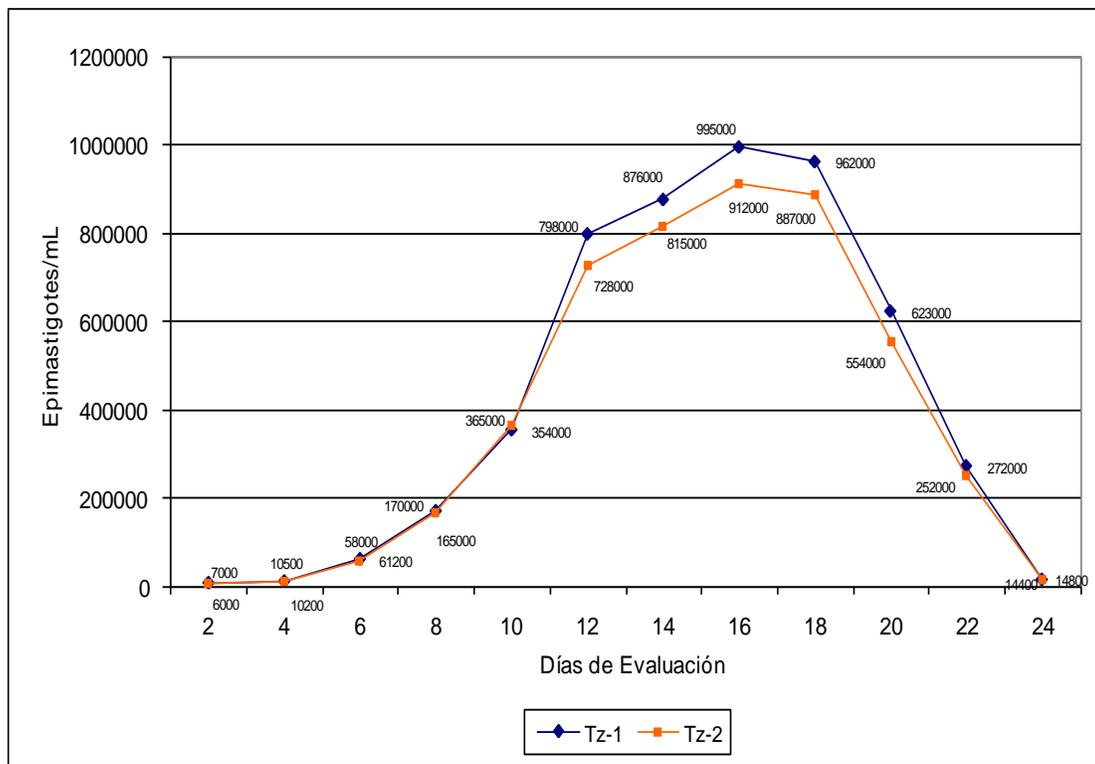


Fig. 1. Crecimiento de epimastigotes de las poblaciones Tz-1 y Tz-2 de *Trypanosoma cruzi*, procedentes de Zaña-Lambayeque-Perú, en medio de cultivo BHI.

Todo ello permite afirmar que el tipo de medio empleado es la primera razón que permite explicar los resultados obtenidos y la sangre empleada para suplementar el medio, la segunda, ya que se ha encontrado que algunas cepas del parásito para su óptimo crecimiento necesitan hemoglobina humana o de otra procedencia específica ^{15,25}. Adicionalmente, como producto del metabolismo intermediario, el parásito

produce gran cantidad de algunos ácidos orgánicos (acetato, succinato, L-alanina, ácido láctico, etanol, glicerol) que estarían acidificando el pH del medio, aspecto que variaría en cada población debido a que cada una de ellas produciría distintas sustancias y en cantidades distintas ^{13,25}

El metabolismo de los kinetoplastidos se caracteriza por un excepcional grado de flexibilidad, hecho que les confiere a responder adecuadamente a los cambios nutricionales drásticos; para ello, los peroxisomas crecen y se multiplican por fisión nuclear y después de ello estos organelos maduros pierden su capacidad de incorporar proteínas adicionales, de manera que para lograr ello el organismo prepara nuevos glicosomas adaptados a una nueva situación: organelos con un diferente set de enzimas cuya expresión es inducida por las alteraciones de las condiciones de crecimiento. Similarmente la degradación de estos organelos es inducible y selectiva, así los glicosomas viejos son eliminados removidos por astofagia^{17,18}. Implicando que estas poblaciones de *T. cruzi* (Tz-1 y Tz-2) tendrían un comportamiento similar de reemplazo de los glicosomas viejos y una buena adaptabilidad a los cambios en su medio, pero al comparar con otras poblaciones de distintos países^{9,15}, estarían presentando una variedad genética en la velocidad de reemplazo de glicosomas nuevos adaptados a las nuevas condiciones del medio ^{18,23,25,26}.

Tan involucrados en el metabolismo como los glicosomas, se hallan los reservosomas, organelos de reserva energética presente en el parásito y que almacena macromoléculas ingeridas, las cuales pueden ser usadas en el proceso de transformación ^{23,25}, lo que implicaría que el tamaño de las reservosomas en la población Tz-2 sea relativamente menor a la población Tz-1, haciendo que el nivel de crecimiento sea un poco menor; asimismo, observándose aún presencia de formas sanguíneas en su morfología normal así como en proceso de conversión a epimastigotes, durante más días, en la población Tz-2.

Finalmente, el otro organelo implicado también en el metabolismo es el acidocalcisoma, el cual es un organelo acumulador de energía conteniendo una gran cantidad de Ppi inorgánico en vista de la presencia de una H⁺- ATPasa en la membrana del acido calsisoma, jugando un papel en la regulación del pH citoplasmático y como centro de la osmoregulación del parásito ^{23,25,26}.

La resistencia de *T. cruzi* a drogas quimioterapéuticas como nifurtimox, benznidazol además del violeta de genciana varía de 0% a 100% y esto puede ser relacionado a la preferencia miotrópica de cepas y predominancia de formas sanguíneas gruesas, dentro de las cuales las cepas sensibles son miotrópicas como reticulotrópicas mostrando predominancia de formas delgadas, además, algunos aspectos como la variación en la absorción y metabolismo de la droga, el estado morfológico del parásito pueden ser implicados ^{4,14,15}.

El crecimiento encontrado en las tres primeras concentraciones de violeta de genciana en porcentajes distintos y reducción en las dos de mayor concentración es similar a lo hallado en la cepa GM aislada en Brazil que presentó un máximo crecimiento también a los 16 días de inoculación y presencia de crecimiento en las mismas concentraciones del colorante (0.01, 01 y 1.0 ug/mL), así como a las cepas RAL y MC obtenidas en Bolivia que, a pesar de tener su pico máximo de crecimiento en días anteriores (entre 9 y 11 días de inoculación), muestran igualmente tendencia a mantener su crecimiento en porcentajes variables, a las mismas concentraciones del colorante ¹⁰. Esto estaría relacionado con el tipo de parásito presente en el huésped vertebrado experimental: el modelo ratón, el cual cuando se infecta con las poblaciones obtenidas en el ambiente natural muestra predominio de las formas gruesas de tripomastigota sanguíneo ^{14,15}.

A manera de conclusión, en base a los hallazgos, se podría indicar que las poblaciones investigadas en el presente trabajo alcanzan un óptimo crecimiento máximo al 16° día postinoculación, con una fase logarítmica estable y bastante prolongada en medio bifásico BHI, que muestran susceptibilidad alta a las concentraciones de 10.0 ug/mL y 100.0 ug/mL de violeta de genciana. Por lo tanto, se podría recomendar

el uso de este medio en trabajos in vitro con poblaciones nativas del parásito aisladas de diferentes zonas del país y el uso de las concentraciones encontradas efectivas de violeta de genciana únicamente en bancos de sangre de hospitales o como controles en la evaluación in vitro de la susceptibilidad de poblaciones nativas de *T. cruzi* aun no investigadas a agentes quimioterapéuticos conocidos o en fase de prueba.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moncayo A, Silveira S. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem Instituto Oswaldo Cruz 2009; 104(Suppl. 1):17-30
2. Rassi Jr A, Marin-Neto JA. Chagas Disease. Lancet 2010; 375: 1388-1402
3. Carod-Artal FJ, Gascon J. Chagas Disease and stroke. Lancet Neuro J 2010; 9: 533-542
4. Lescure FX, Le Loup G, Freiløj H, Develoux M, Paris L, Brutus L, et al. Chagas Disease: changes in knowledge and management. Lancet Infect Dis 2010; 10: 556-570
5. World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO Press, Geneva. 2010
6. Bayer AM, Hunter GC, Gilman RH, Cornejo del Carpio JG, Naquira C, Bern C, Leoy MC: Chagas Disease, migration and community settlement patterns in Arequipa, Peru. PLoS Negl Trop Dis 2009; 3(12): e567
7. Ancca J, Vega S, Pinto J, Náquira C. Caracterización genética de *Trypanosoma cruzi* aislado de triatomos de áreas endémicas de la enfermedad de Chagas en el Perú. Rev Ibero-latinoam parasitol 2009; 1:8-14
8. Botero LA, Mejia AM, Triana O. Caracterización biológica y genética de dos clones pertenecientes a los grupos I y II de *Trypanosoma cruzi* de Colombia. Biomédica 2007; 27(Supl. 1): 64-74
9. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS; Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(7): 1051-1054
10. Martínez D R, Escario J, Nagal R and Gómez B A. Biological Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96(1): 53-59.
11. Bertoli M, Hitomi A M, De Ornelas T M, Marques D S and Lucia G M. Infectivity for mice of *Trypanosoma cruzi* I and II strains isolated from different hosts. Parasitol Res 2006; 99: 7-13.
12. Díaz-Limay E, Escalante H, Jara CA. Niveles de parasitemia y alteraciones hitopatológicas en *Mus musculus* BALB/c infectados con *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Panstrongylus chinai* del valle Chaman, La Libertad, Perú. Parasitol Latinoam 2004; 59: 153-158
13. Saldaña C, Cordova O, Vargas F. Utilización de *Lepidium peruvianum*, maca, como medio de cultivo para el crecimiento de *Trypanosoma cruzi*. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2006; 23(2): 137-140
14. Rodríguez-Morales AJ. Nuevas perspectivas en el manejo terapéutico de la enfermedad de Chagas. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2005; 22(2): 123-133
15. Zulantay AI, Apt W. Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Rev Med Chile 2011; 139: 247-257
16. Cardoso J, Soares MJ. In vitro effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105(8): 1026-1032
17. Escobar P. Leal SM, Herrera LV, Martinez JR, Stashenko E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp. Essential oils and their major components. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105(2): 184-190
18. Rojas J, Solis H, Palacios O. Evaluation in vitro de las actividades anti *Trypanosoma cruzi* de aceites esenciales de diez plantas medicinales. An Fac med 2010; 71(3): 161-165
19. Herrera C, Vallejos GA, Loaiza R, Zeledon R, Urbina A, Sepulveda-Boza S. In vitro activity of thyenil-2 nitropropene compounds against *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(7): 980-985

20. Da Silva CF, Da Silva PB, Batista MM, Dalioy A, Tidwell RR, Soeiro MNC. The biological in vitro effect and selectivity of aromatic dicationic compounds on *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105(3): 239-245
21. Martínez D R, Escario J, Nagal R and Gómez B A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96(1): 53-59.
22. Jara C, Escalante H, Díaz E y Roldán J. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en el valle de Zaña, Lambayeque-Perú. SCIENDO 2002; 5: 9-21.
23. Hannaert V, Bringaud F, Opperdoes F R and Michels P A M. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in kinetoplastida. Kinetoplastid Biol & Dis 2003; 2:1-30.
24. Lauria P L, Santana J M, Tavares F S and Texeira A R L. Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients: I behavioral characterization in vitro. Rev Soc Bras Med Trop 1997; 30(3):187-192.
25. Maya JD, Cassals BK, Hurriaga-Vasquez P, Ferreira J, et al. Mode of action on natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comp Biochem & Physiol, Part A, 2007; 146: 601-620
26. Junior COR, Alves RO, Rezende CAM, da Costa CF, et al. Trypanocidal activity of lipophilic diamines and amino alcohols. Biomedic & Pharmacoterp 2010; 64: 624-626



Ciclo biológico y comportamiento de *Marmara gulosa* (Lep.: Gracillariidae) en el cultivo de *Punica granatum* en Alto Salaverry (La Libertad, Perú). 2013.

Biological cycle and *Marmara gulosa* (Lep.: Gracillariidae) behavior in the culture of *Punica granatum* from Alto Salaverry (La Libertad, Peru).2013.

Gaspar Ayquipa Aycho¹, Roberto Rodríguez Rodríguez¹, Ruperto Farroñan Montalvo², Marlon Hoyos Cerna³ y Emeli Haro Valverde³

¹Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo, Perú. ²Empresa Agro Las Dunas E.I.R.L. ³Alumno E.A.P. Ciencias Biológicas UNT

RESUMEN

Se describen las formas evolutivas y se determinó la duración del ciclo biológico y algunos aspectos del comportamiento de *Marmara gulosa* Guillén & Davis, 2001 (Lep.: Gracillariidae) “gusano minador del fruto” en el granado, *Punica granatum* Var Wonderfull. La investigación se realizó en la Empresa Agro Las Dunas E.I.R.L, ubicado en el ámbito del Proyecto Especial CHAVIMOCHIC, de donde se recogieron frutos infestados por el insecto plaga; en el laboratorio, las larvas fueron criadas a partir de estos frutos, a fin de determinar el ciclo biológico, describir los diferentes estados de desarrollo y algunos aspectos del comportamiento. El ciclo biológico en condiciones de laboratorio, a 24.5 ± 0.94 °C y 74.17 ± 1.27 HR%, tuvo una duración de 41.7 ± 5.19 días para la hembra y 40.36 ± 5.09 días para el macho. Los adultos son de hábitos crepusculares, vuelos cortos, con larvas de gran capacidad minadora las que pueden empupar en la superficie del fruto o en el suelo.

Palabras clave: Ciclo biológico, comportamiento, *Marmara gulosa*, *Punica granatum*.

ABSTRACT

The developmental stages, biological cycle duration and some aspects of the behavior of *Marmara* sp. (Lep.: Gracillariidae) “minatory worm of the fruit” in *Punica granatum* Var. wonderfull was described. The work was carried out in Agro Las Dunas E.I.R.L. Enterprise, located in the area of CHAVIMOCHIC Special Project, where pieces of fruit infested by the plague insect were gathered, in the laboratory the breeding of larvae was made from these fruits on to determine the biological cycle, describe the different states of development and some aspects of behavior. The result of the obtained morphological description allowed determining that the species correspond to *Marmara gulosa* Guillén & Davis, 2001. The biological cycle duration, under laboratory conditions, was 24.5 ± 0.94 °C and 74.17 ± 1.27 HR%, for the female and 40.36 ± 5.09 days for the male, respectively. The adult ones are of crepuscular habits, short flies, with larvae of a great minatory capacity, which can form pupa in the fruit surface or the soil.

Keywords: Biological cycle, behavior, *Marmara gulosa*, *Punica granatum*

INTRODUCCIÓN

El cultivo del granado, *Punica granatum*, como cualquier otro, está expuesto al ataque de los insectos plaga; así, entre los más importantes a nivel global se hace referencia a: la conchuela negra del olivo, *Saissetia oleae*; el pulgón verde-amarillo, *Aphis punicae*; el pulgón negro, *A. gossypii*; la cochinilla, *Pseudococcus citri*; las queresas, *Saissetia oleae* y *Ceroplastes sinensis*; los lepidópteros, *Cryptoblabes gnidiella*, *Myelois ceratoniae* y *Zeuzera pyrina*; la mosca de la fruta, *Ceratitidis capitata*; y, los ácaros, *Tenuipalpus punicae*, *Eriophyes granati* y *Lorria formosa*¹.

En el Perú, Casma (Ancash) figura como el principal productor de granados y se han registrado los siguientes insectos plaga: pulgón negro, *A. gossypii*, en hojas y frutos; mosca blanca, *Bemisia tabaco*, en hojas tiernas y brotes; larvas de *Chrysodeixis includens* en el follaje; larvas de *Heliothis virescens* en botones florales; *Planococcus citri* en hojas, ramas y frutos; bicho del cesto, *Oiketicus kirbyi*, en hojas y frutos; mosca de la fruta, *C. capitata* en el fruto maduro y el denominado minador del fruto, *Marmara* sp.². Al mismo tiempo, inspecciones realizadas en el fundo Agro Las Dunas E.I.R.L. de la irrigación CHAVIMOCHIC (Alto Salaverry, La Libertad) corroboraron el ataque del minador del fruto, manifestándose con infestaciones significativas en frutos verdes de reciente formación³.

Considerando que se requieren de medidas de control integrado de *Marmara*, evitando en lo posible el uso unilateral del uso de plaguicidas en los cultivares cada vez más crecientes de granados y que para poder tomar medidas de esta naturaleza es de vital importancia el estudio del ciclo biológico y comportamiento de esta plaga emergente, se llevó a cabo una investigación dirigida a describir las formas evolutivas, así como determinar la duración del ciclo biológico y aspectos del comportamiento de *Marmara gulosa* (Lep.: Gracillaridae) en el cultivo de *Punica granatum* “granado”, tanto en condiciones de campo como de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Lugar de ejecución del trabajo

El trabajo se realizó en campo en el cultivo de *Punica granatum* “granado” variedad “Wonderful”, durante los estados fenológicos de crecimiento y maduración de los frutos, en una extensión de 10 Ha. El cultivo está ubicado en el Fundo Agro Las Dunas, Alto Salaverry, Trujillo, La Libertad, dentro del ámbito del Proyecto Especial CHAVIMOCHIC, instalado en suelo arenoso, con un sistema de riego por goteo. Las observaciones complementarias de la biología y comportamiento del insecto plaga se realizaron en el laboratorio de Entomología del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.

Trabajo en campo

En campo se seleccionaron frutos verdes y maduros infestados con diferentes instares larvales del “minador del fruto del granado” *M. gulosa*. Estos frutos atacados fueron señalados individualmente con una cinta plástica amarilla de 5 x 40 cm, para su rápida ubicación. Las larvas infestantes en el fruto fueron señaladas con una espina de la misma planta hospedera, lo que permitió realizar las observaciones periódicas para determinar el desarrollo larval y describir el comportamiento y avance del daño en cada uno de los frutos infestados. A su vez se recolectaron frutos infestados los cuales fueron llevados al laboratorio para la crianza de las larvas y determinar el ciclo biológico.

Trabajo en laboratorio

Se acondicionaron frutos minados, traídos del campo, en envases cuadrados de 2.4 L, de plástico transparente, a las tapas de cada uno de estos depósitos se les hizo una abertura que luego fue sellada con poliseda para la aireación del fruto. En el fondo del envase se colocó papel toalla y un vaso pequeño transparente de 10 cc con algodón humedecido con agua destilada; luego se colocaron estos frutos minados con una porción pequeña de algodón en el pedúnculo de cada fruto para facilitar la absorción de la solución nutritiva hidropónica A y B (5ml x 2 ml). Los cambios de algodón para el fruto se realizaron tres veces por semana; mientras que, para mantener la cámara húmeda para la turgencia de los frutos y

favorecer el desarrollo normal de las larvas solo se hizo dos veces semana. Con el termohigrómetro FWIW se registraron la temperatura y humedad relativa que fueron de 24.5 ± 0.94 °C y 74.17 ± 1.27 HR% respectivamente

En los frutos infestados y acondicionados en los recipientes plásticos se determinó el ciclo biológico del insecto plaga. Se observaron y se describieron las características morfológicas de los diferentes estados de desarrollo; asimismo, se registró el tiempo de duración en días del periodo de incubación del huevo, tiempo de duración de los diferentes instar larvales, pre-pupa, pupa y adulto. Para las descripciones se utilizó estereoscopio y microscopio Olympus y para la toma de fotografías se utilizó la cámara digital LUMIX de PANASONIC de 4x a escala.

Los adultos obtenidos fueron montados, según la técnica descrita por Gómez (2012), la determinación taxonómica se realizó por comparación con las descripciones de Guillen *et al* (2001)

RESULTADOS

Ubicación Taxonómica (Según la Global Taxonomic Data Base of Gracillariidae (Lepidoptera) GBIF data (2014):

Orden: Lepidoptera; Familia: Gracillariidae; Género: *Marmara*; y Especie: *M. gulosa* Guillén & Davis, 2001

Descripción morfológica (Figs. 1 y 2)

Adulto

Cabeza.

Con escamas más pronunciadas y hacia atrás en el vertex, las antenas son filiformes, los ojos son de color rojo vinoso, palpos labiales alargados.

Tórax.

Dorso con escamas de color gris plateado marrón. Alas anteriores con escamas de también de color gris con ápice de color marrón, con cuatro bandas dispuestas a $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ y $\frac{3}{4}$ a lo largo del ala y en la parte sub apical, la banda media más estrecha en el medio, la tercera banda usualmente interrumpida en la mitad, la banda sub apical es corta. Las alas posteriores más estrechas y de color más claro que las anteriores. Las patas con las coxas blancas y negras en su extremo distal, las tibias gris oscuras con escamas blancas en el extremo distal, las tibias mesotorácicas con dos bandas blancas, tibias meso y metatorácicas con dos espolones en su extremo distal, más grandes en el las metatorácicas; tarsos blancos con escamas de color marrón oscuro.

Abdomen

Dorsalmente gris plateado, ventralmente con seis bandas blanco cremosas. El macho posee el extremo caudal agudo y en la hembra es más obtuso.

Huevo

Recién puesto es de color blanco hialino, largo ovalado y aplanado colocado sobre la epidermis del fruto.

Larva

Son hipermetamorfósicas con tres formas distintas. La primera larva minadora con cuerpo depresso y amarillento semitransparente, cabeza depresa y triangular con labro contraído en su base y prolongado en dos lóbulos laterales aplanados; mandíbulas grandes aplanadas con tres apéndices dentadas y adaptadas para minar por debajo de la epidermis de las plantas hospederas; patas y propatas ausentes. La longitud máxima de la larva fue de 3.6 mm. La tercera larva hilandera, la forma más generalizada de la larva fue con cuerpo cilíndrico y de color rojo anaranjado en la fase final; cabeza más redondeada y poco esclerotizada, poseen propatas rudimentarias con una longitud máxima de 4,2 mm. Entre ambas formas existe una forma intermedia de transición generalmente inactiva, no se alimentan.

Pupa

Tipo obtecta de aproximadamente 2 mm de largo de color marrón claro, cremaster con tres pares de espinas.

Cocón

Consta de una telilla de seda blanca que se puede formar sobre la corteza del fruto o en el suelo y externamente está cubierta por varias “burbujas” espumosas.

Algunos aspectos del comportamiento (Fig. 3)

La polilla es crepuscular, con actividad principal en horas de la madrugada y de la noche. Las larvas ocasionan largas minas irregulares en los frutos las que a veces se pueden entrecruzar alcanzando una longitud máxima de 100 cm aproximadamente; las larvas al abandonar las minas pueden empupar y formar su cocón en la epidermis del fruto o en el suelo. Un fruto puede ser infestado hasta por tres larvas simultáneamente.

Ciclo biológico

El ciclo biológico, en condiciones de laboratorio a 24.5 ± 0.94 °C y 74.17 ± 1.27 H°, tuvo una duración de 41.7 ± 5.19 días para la hembra y 40.36 ± 5.09 días para el macho (Tabla 1). Se registraron cuatro instares larvales.



Fig. 1. Observación dorsal y ventral de la hembra de *Marmara gulosa*



Fig. 2. Estados biológicos de *Marmara gulosa*: larva (izquierda), pupa (centro), restos del cocón pupal (derecha).

DISCUSIÓN

La descripción morfológica de los diferentes estados del insecto plaga estudiada hace posible que correspondan con la especie *Marmara gulosa*⁴ de acuerdo a la especie que se encuentra registrada en la data base de Gracillariidae⁵. Otro aspecto que fortalece este planteamiento es la gran capacidad polífaga de este insecto minador que ataca a una amplia diversidad de plantas entre los cuales se incluyen frutales^{6,7}, aun cuando estos autores no registran a *M. gulosa* atacando al fruto del granado, en este caso podría ser el primer registro para este cultivo de la variedad Wonderful en Perú. Asimismo, en las condiciones del ámbito del Proyecto Especial CHAVIMOCHIC se viene observando a esta plaga, atacando además del cultivo de granado al espárrago y palto.



Fig. 3. Daño de *Marmara* sp. en frutos de *Punica granatum* “granado” Var. Wonderful: minas (superior izquierda), larva III (superior derecha), larva III y IV (inferior izquierda), mina de larva IV (inferior derecha) .

Tabla 1. Duración promedio en días las diferentes fases de desarrollo y del ciclo biológico de *Marmara gulosa* en el laboratorio a 24.5 ± 0.94 °C y 74.17 ± 1.27 HR%. Enero 2013- Marzo, 2014.

Estado	N° de individuos	Promedio (\bar{X}) \pm ds (días)	
Huevo	12	4.0 \pm 0.2	
Larva I	27	3.6 \pm 0.91	
Larva II	27	2.6 \pm 1.16	
Larva III	27	3.3 \pm 0.64	
Larva IV	10	3.21 \pm 0.42	
Pre-Pupa Y Pupa	12	11.9 \pm 0.28	
Adulto	15	Hembra	Macho
		12.86 \pm 1.58	11.75 \pm 1.48
Total		41.7 \pm 5.19	40.36 \pm 5.09

Las características descritas para los adultos, larva, cocón pupal y pupa de *M. gulosa*, son similares a lo informado por Guillén et al.⁶, aunque se debe puntualizar que en este trabajo se ha observado las larvas de color rojo anaranjado, característica que no se indica en la investigación referida.

El ciclo biológico del insecto determinado, en condiciones de laboratorio a 24.5 ± 0.94 °C y 74.17 ± 1.27 HR %, fue de una duración de 41.7 ± 5.19 para la hembra y 40.36 ± 5.09 días para el macho y a la vez se registraron cuatro instars larvales, estos datos son similares a lo registrado previamente⁴, habiéndose informado que el ciclo biológico total fue de 39.4 días a 26 ± 0.5 °C, y los instars larvales pueden variar hasta cinco, sin dar una clara explicación al respecto, indicando que en la mayoría de los

casos fueron de cuatro instars; mientras que, Stelinski⁸ sólo registró cuatro instars y sus descripciones de los estados biológicos también son similares a lo descrito en este trabajo.

En el campo se observó que los adultos son de hábitos crepusculares y las larvas causan minas en la superficie de los frutos del granado que generalmente son serpenteantes y algunas veces pueden entrecruzarse, las larvas empupan en la epidermis del fruto o en el suelo, este tipo de comportamiento también fueron anteriormente⁸. Se ha observado que esta plaga ataca al granado durante la etapa de formación y maduración del fruto es decir a partir de octubre a abril, es decir durante el verano, esto concuerda con Guillen et al⁶ quienes afirman que esta plaga se manifiesta en los meses de verano en huertos comerciales de “toronja” o “pomelo” *Citrus paradisi* en California, pudiendo llegar en este caso hasta el mes de julio.

CONCLUSIONES

- Se registra por primera vez en el Perú a *Marmara gulosa* en el cultivo de granado.
- La duración total del ciclo biológico de *M. gulosa* es de 41.7 ± 5.19 y 40.36 ± 5.09 días para la hembra y el macho, respectivamente.
- Las larvas tienen gran capacidad minadora produciendo minas largas e irregulares, que a veces se entrecruzan en la superficie de los frutos verdes y maduros.
- Los adultos son de hábitos crepusculares, con mayor actividad en horas de la madrugada y tempranas horas de la noche.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. USEP. El granado. Facultad de Ciencias Agronómicas. Univ. de Chile. 2012. www.indap.gob.cl/Docs/Documentos/Fruticultura/Granada/EL%20GRANADO.%20u%20DE%20chile.pdf
2. Ayquipa G, Mendocilla R, Valderrama S. Determinación de insectos plaga del cultivo de *Punica granatum*, Fundo Agrícola Chavín de Huantar-Casma, Ancash-Perú, enero-diciembre, 2012. REBIOL 2012; 21(1): 79-85.
3. Ayquipa G, Rodríguez R. Comunicación personal. Dpto. de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2012.
4. GBIF. Belgian Biodiversity Platform. 2014. Acceso: <http://www.gracillariidae.net/species/queryAjax>
5. Guillén M, Davis DR, Heraty JM. Systematics and biology of a new, polyphagous species of *Marmara* (Lepidoptera: Gracillariidae) infesting grapefruit in the southwestern United States. Proceed Entomol Soc Washington 2001; 103: 636-654.
6. Guillén M, Heraty JM, Luck R. Seasonal Variation and Infestation Incidence by *Marmara gulosa* (Lepidoptera: Gracillariidae) on Grapefruit in the Coachella Valley, California. J Econom Entomol 2003; 96(3):577-583.
7. Gómez A. Manual de Entomología General. Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad, Perú. 2005.
8. Stelinski L. Featured Creatures, University of Florida. 2013. http://entnemdept.ufl.edu/creatures/citrus/citrus_peelminer.htm.

Guía para los autores

La revista **REBIOL** es el órgano oficial de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo que publica investigaciones en los diversos campos de las Ciencias Biológicas y afines. Se admiten investigaciones científicas y tecnológicas que no estén publicados parcial ni totalmente o en estado de revisión en otro medio de publicación. La recepción de los informes es permanente y la prioridad de su publicación se hará de acuerdo al orden en el que fueron aceptados y aprobados. La publicación se realizará luego de ser sometido a un arbitraje anónimo por personas versadas.

Naturaleza de los informes.

Se acepta para publicaciones sólo aquellos informes de las categorías siguientes: **a) trabajos originales**, que son informes completos, orientados al registro de hechos o fenómenos y al desarrollo de conceptos (generalizaciones, leyes o teorías; **b) notas científicas**, que son artículos cortos, sobre asuntos muy específicos, que aportan al conocimiento, pero no necesariamente al desarrollo de conceptos, cuyos resultados son difícilmente verificables, debido a que son hechos o fenómenos muy esporádicos o la muestra es muy difícil de encontrar (también puede prepararse de esta manera sobre nuevos métodos, técnicas y aparatos y redactados de modo que no es posible su repetición por razones de propiedad industrial y otros; y **c) revisiones o monografías**, que son informes críticos en los que se reúnen, analizan y discuten informaciones ya publicadas y relativas a un solo tema.

Preparación del manuscrito

Los manuscritos deben ser redactados de modo impersonal, en una extensión máxima de 20 páginas para los trabajos originales, 10 para las notas científicas y 35 para las revisiones bibliográficas. Deben ser escritos a doble espacio, con márgenes de 3 cm a cada lado.

Se recomienda evitar errores gramaticales y de puntuación en el texto y seguir las normas internacionales relacionadas con la escritura de los nombres científicos, de números, de símbolos o abreviaturas de prefijos de pesos y medidas, matemáticos, estadísticos y químicos. Además, no se debe escribir palabras completamente con mayúscula, salvo para siglas y en las figuras.

Estructuración del manuscrito.

Los trabajos originales y las notas científicas deben estructurarse en este orden: **título** (en español e inglés, de una extensión aproximada a no mayor de las 20 palabras, sin abreviaturas, fórmulas químicas ni autores de taxa científicos), **autor(es)** y **dirección(es)**, **resumen y abstract** (en un solo párrafo y extensión aproximada a las 200 palabras), **introducción, material y métodos, resultados, discusión, reconocimientos** (opcional y sólo a personas que han contribuido significativamente a la investigación), **referencias bibliográficas**), **tabla(s) y/o figura(s)** (opcional) y leyendas de figuras. Con las mismas características, las revisiones, por su lado, deben estructurarse en este orden: **título, autor(es) y dirección(es)**, **tabla de contenidos, introducción, tópicos de revisión, reconocimientos** (opcional), **referencias bibliográficas, tablas y figuras** (opcional) y leyendas de figuras.

Las referencias y las citas bibliográficas deberán estructurarse acogiéndose a uno de los sistemas internacionales, de preferencia el de **Vancouver**. Las tablas sólo deben tener tres líneas horizontales y ninguna vertical, un título claro y entendible por sí mismo, sin necesidad de recurrir al texto y precedido de un número arábigo.

Descripción de los procedimientos para el manejo de los manuscritos

Los autores enviarán sus manuscritos al Editor (cjara@unitru.edu.pe) conjuntamente con una carta declarativa.

El Editor verifica si el material enviado se ajusta a la línea editorial de la revista. Si es conforme, el artículo es sometido a un sistema de arbitraje de pares (*peer review*), recurriendo a mínimo dos (02) revisores o evaluadores externos, para que en el plazo máximo de quince días expresen sus opiniones (según la “*Hoja de Opinión*”), recomendando la aceptación o rechazo del artículo. Si el artículo no se ajusta a la línea editorial, el Editor se reserva el derecho de enviar un informe al autor para cambiar o rehacer su artículo, total o parcialmente, teniendo los autores que iniciar nuevamente el proceso de envío de su trabajo. En el peor de los casos, el manuscrito se rechaza y es comunicado a los autores, adjuntando un informe con las razones de la denegación. Los nombres de los revisores se mantienen en el anonimato para el(los) autor(es) durante todo el proceso. *Aunque, para facilitar el arbitraje, los autores pueden enviar una lista de cuatro (4) posibles revisores, especialistas en el tema del artículo, con sus respectivas direcciones de correo electrónico.*

Hoja de Opinión

Los revisores responden a las siguientes preguntas:

1. ¿El manuscrito representa una contribución nueva y original?
2. ¿El resumen es adecuado?
3. ¿Las palabras clave son las adecuadas?
4. ¿El material enviado especifica claramente el propósito del trabajo?
5. ¿El método, estrategia, intervención o experimento es idóneo, aplicable y replicable?
6. ¿Los resultados son válidos para otros contextos y realidades?
7. ¿Se logra el objetivo declarado?
8. ¿Se cita bibliografía adecuada y actualizada para el desarrollo del tema?
9. ¿Considera que las conclusiones están acordes con la información que se presenta?
10. ¿El material debe ser revisado en términos de estilo, ortografía y gramática?
11. ¿Cómo calificaría este manuscrito?

Sobresaliente __; Muy bueno __; Bueno __; Regular __; Deficiente __.

12. ¿El artículo es aceptable para su publicación?

SI, en su forma actual.

SI, con algunas modificaciones

SI, después de una revisión importante

NO, debe ser rechazado.

Tras el regreso de las opiniones, éstas se envían al autor para que tenga en cuenta las sugerencias y/o comentarios de los revisores y vuelva a presentar el manuscrito. Se repite el procedimiento hasta que no haya observaciones.

Nota

Mientras el manuscrito se esté evaluando para su publicación, no podrá ser enviado a otras revistas. Una vez aprobado para publicación, todos los derechos de reproducción total o parcial pasarán a la revista REBIOL.

Envíos

Los manuscritos deberán ser preparados en Word para Windows (formato electrónico y digital) y enviados a:

REBIOL
Av. Juan Pablo II s/n - Ciudad Universitaria
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional de Trujillo
Trujillo, Perú
Email: cjara@unitru.edu.pe