

NUTRICIÓN **MINERAL** • DE LAS • **PLANTAS**



BIFORTIFICACIÓN CON **MICRONUTRIENTES** EN CULTIVOS **AGRÍCOLAS**

EDITORES

Esteban Sánchez Chávez
Luis Romero Monreal
Pablo Preciado Rangel
Juan Manuel Soto Parra
Sandra Pérez Álvarez
María Antonia Flores Córdova
Karla Ivonne Hernández Figueroa



NUTRICIÓN MINERAL DE LAS PLANTAS

BIOFORTIFICACIÓN CON MICRONUTRIENTES EN CULTIVOS AGRÍCOLAS

EDITORES

Esteban Sánchez Chávez
Luis Romero Monreal
Pablo Preciado Rangel
Juan Manuel Soto Parra
Sandra Pérez Álvarez
María Antonia Flores Córdova
Karla Ivonne Hernández Figueroa

Título de la obra:

Nutrición mineral de las plantas
Biofortificación con micronutrientes en cultivos agrícolas

Editores:

Esteban Sánchez Chávez
Luis Romero Monreal
Pablo Preciado Rangel
Juan Manuel Soto Parra
Sandra Pérez Álvarez
María Antonia Flores Córdova
Karla Ivonne Hernández Figueroa

Impresión:

Plácido Cuadros C/Gonzalo Gallas, 13
18003 Granada, España

Diseño de cubiertas:

Emilio Enrique Hernández Abundis

Queda rigurosamente prohibida, sin la autorización escrita de los titulares del "copyright" o de los titulares de artículo o apartado correspondiente, bajo las sanciones establecidas en las leyes, la reproducción total o parcial esta obra por cualquier medio, electrónico o mecánico, incluidos la reproducción, microfilmación, grabación y tratamiento, así como la distribución de ejemplares de ella mediante alquiler o préstamo público.

ISBN 978-84-89720-24-5**DEPÓSITO LEGAL GR 1594-2018**

Copyright © 2018. Los autores. Todos los derechos reservados.

Tabla de Contenido

1	Fitobiofortificación con Zinc, propiedades antioxidantes y perfil ionómico en dos plantas hortícolas: Lactuca sativa y Brassica oleracea	
	1.1 Resumen.....	3
	1.2 Introducción.....	3
	1.3 Materiales y Métodos.....	5
	1.4 Resultados y Discusión.....	6
	1.5 Conclusiones.....	15
	1.6 Agradecimientos.....	16
	1.7 Bibliografía.....	16
2	Biofortificación con Carbonato de Calcio en pimiento Morrón y su efecto en la calidad y capacidad antioxidante	
	2.1 Resumen.....	23
	2.2 Introducción.....	23
	2.3 Materiales y Métodos.....	24
	2.4 Resultados y Discusión.....	25
	2.5 Conclusiones.....	30
	2.6 Bibliografía.....	31
3	Biofortificación con Calcio para mejorar contenido nutricional y conservar calidad de manzana "Top Red"	
	3.1 Resumen.....	35
	3.2 Introducción.....	35
	3.3 Materiales y Métodos.....	36
	3.4 Resultados y Discusión.....	39
	3.5 Conclusiones.....	58
	3.6 Bibliografía.....	59
4	Biofortificación agronómica como clave para la fortificación con micronutrientes en leguminosas	
	4.1 Introducción.....	65
	4.2 Formas de fertilizar.....	65
	4.3 Métodos de aplicación.....	73

4.4 Otras prácticas agrícolas que afectan micronutrientes en los cultivos	78
4.5 Obstáculos y desventajas	81
4.6 Perspectivas y desafíos	81
4.7 Conclusiones	81
4.8 Bibliografía	82

5 Biofortificación en vid

5.1 Biofortificación	93
5.2 Agricultura y Biofortificación	93
5.3 Enfoques transgénicos	94
5.4 Intervención agronómica en vid hacia la fortificación	94
5.5 influencia del anillado sobre la fisiología y bioquímica de la vid	95
5.6 Efecto del raleo de hoja y altura del dosel fotosíntesis y crecimiento de vid.....	96
5.7 Terroir y metabolismo de la vid.....	97
5.8 Bibliografía	98

6 Avances recientes en la biofortificación con Fe y Zn en frijol (Phaseolus vulgaris L.)

6.1 Resumen.....	103
6.2 Introducción	103
6.3 El consumo de frijol y sus beneficios sobre la salud.....	104
6.4 La biofortificación como estrategia para mejorar la calidad nutricional de los cultivos	105
6.5 Biofortificación con Fe y Zn.....	106
6.6 Perspectivas futuras.....	112
6.7 Conclusiones	113
6.8 Bibliografía	114

7 Biofortificación con Selenio en Frijol (Phaseolus vulgaris L.)

7.1 Resumen.....	123
7.2 Introducción	123
7.3 Biofortificación con micronutrientes de cultivos agrícolas.....	124
7.4 Biofortificación con Se e inducción de la capacidad antioxidante	130
7.5 Selenio en la calidad nutricional de los cultivos	136
7.6 Influencia del Selenio sobre el metabolismo nitrogenado con plantas ..	137
7.7 Selenio en la nutrición y la salud humana	137
7.8 Consideraciones finales	139

7.9 Bibliografía	140
------------------------	-----

8 Importancia de la Nanotecnología en la biofortificación con micronutrientes en cultivos agrícolas

8.1 Resumen.....	157
------------------	-----

9 Calidad nutraceutica y contenido mineral en leguminosas biofortificadas con Selenio

9.1 Resumen.....	16
9.2 Introducción	161
9.3 Metabolismo del Selenio en las plantas.....	161
9.4 Efectos de la adición de Se a las plantas	163
9.5 Biofortificación de leguminosas.....	164
9.6 Conclusiones	164
9.7 Agradecimientos	164
9.8 Bibliografía	167

10 Biofortificación con Zinc en nogal pecanero

10.1 Introducción	173
10.2 Bibliografía	180

11 Aplicaciones del Quitosano como bioestimulante y promotor de la nutrición en el cultivo de cereales

11.1 Resumen.....	185
11.2 Introducción	185
11.3 Acción bioestimulante del Quitosano en el crecimiento de las plantas	186
11.4 Potenciación de las relaciones simbióticas beneficiosas plantas-organismo.....	188
11.5 Nutrición de las plantas y la fertilidad del suelo.....	190
11.6 Conclusiones.....	191
11.7 Bibliografía	192

12 Evaluation of different seaweed extracts and compost on vegetative growth, yield and fruit nutraceutical quality cucumber (Cucumis sativus)

12.1 Abstract.....	197
12.2 Introduction	197

12.3 Materials and Methods	198
12.4 Results and discussion.....	201
12.5 Conclusions	205
12.6 References	226

13 Los micronutrientes en el cultivo in vitro

13.1 Resumen	233
13.2 Introducción	233
13.3 El cultivo in vitro vegetal	233
13.4 Los microelementos o micronutrientes en el cultivo in vitro en plantas	238
13.5 El cultivo in vitro de microorganismo de interés agrícola.....	241
13.6 Microelementos en el cultivo in vitro de microorganismo	245
13.7 Bibliografía	248

14 El ácido salicílico y su participación en el rendimiento y producción de metabolitos en las plantas

14.1 Resumen.....	257
14.2 Introducción	257
14.3 Uso de elicitores	258
14.4 Mecanismo de acción del ácido salicílico en plantas.....	258
14.5 El ácido salicílico en el crecimiento y rendimiento de cultivos	259
14.6 Efecto del AS en la fotosíntesis	259
14.7 Ácido salicílico en el sistema antioxidante	260
14.8 Papel del AS en el daño oxidativo de las plantas	261
14.9 Efecto del ácido salicílico en la calidad nutracéutica de frutos	261
14.10 Conclusiones.....	262
14.11 Bibliografía	263

Autores

Dra. Ludy Acosta Sánchez

Instituto Tecnológico de Torreón.
Carretera Torreón San Pedro Km 7.5
Ejido Ana, Torreón, Coahuila, México.

Dra. Angelia Anahí Acevedo

Barrera

Facultad de Ciencias Agrotecnológicas
de la Universidad Autónoma de
Chihuahua, México.

Dra. Lluvia Stephany Angulo

Atondo

Universidad Autónoma de Sinaloa,
campus Culiacán, Blvd. De las
Américas y Blvd. Universitarios S/N
Ciudad Universitaria, Culiacán, Sinaloa,
México,

Dra. Cecilia Antuna González

Universidad Tecnológica de Bahía de
Banderas, Blvd. Nuevo Vallarta No. 65
Pte, Nuevo Vallarta, Nuevo Vallarta,
Nayarit, México

Dra. Yurena Barrameda Medina

Departamento de Fisiología Vegetal,
Facultad de Ciencias, Universidad de
Granada, 1807, Granada, España.

Dra. Begonia Blasco León

Departamento de Fisiología Vegetal,
Facultad de Ciencias, Universidad de
Granada, 1807, Granada, España.

Dr. Efraín De la Cruz Lázaro

División Académica de Ciencias
Agropecuarias. Universidad Juárez
Autónoma de Tabasco, Villahermosa,
Tabasco, México.

Dr. Emmanuel Alexander

Enríquez Acosta

Universidad Técnica de Cotopaxi,
Extensión La Maná, Av. Los Almendros
y Pujilí, Edificio Universitario, La Maná,
Ecuador.

Dra. María Antonia Flores

Córdova

Facultad de Ciencias Agrotecnológicas
de la Universidad Autónoma de
Chihuahua, México.

Dr. Jairo Baldemar Flores

Plascencia

Facultad de Ciencias Agrotecnológicas
de la Universidad Autónoma de
Chihuahua, México.

Dra. Gabriela Lizbeth Flores

Zamora

Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-
IPN, Unidad Sinaloa, Departamento de
Biotecnología Agrícola, Blvd. Juan de
Dios Bátiz Paredes No. 250. Guasave,
Sinaloa, México

Dr. Manuel Fortis Hernández

Instituto Tecnológico de Torreón.
Carretera Torreón- San Pedro A.P. 42,
km 7.5, Torreón, Coahuila, México.

Dr. Miguel Ángel Gallegos Robles

Facultad de Agricultura y Zootecnia,
Universidad Juárez del estado de
Durango, Ejido Venecia, carretera
Gómez Palacio Tlahualilo km 35,
Durango. México

Ing. Ana María Garduño Zepeda

División Académica de Ciencias
Agropecuarias. Universidad Juárez
Autónoma de Tabasco, Villahermosa,
Tabasco, México.

Dra. Marcela González López

Universidad Politécnica del Valle de
Toluca, Carretera Toluca-Almoloya de
Juárez km. 5.6 Santiaguito
Tlalcilcali, Almoloya de Juárez,
Estado de México. México

**Dra. Martha Aracely Hermosillo
Cereceres**

Departamento de Fisiología Vegetal,
Facultad de Ciencias, Universidad de
Granada. Ave. Fuente Nueva s/n,
18071, Granada España.

**Dr. Luis Guillermo Hernández
Montiel**

Centro de Investigaciones Biológicas
del Noroeste (CIBNOR), Instituto
Politécnico Nacional No. 195, Colonia
Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz,
Baja California Sur, México.

Dra. Liliana Lara Capistrán

Universidad Veracruzana Campus
Xalapa, Facultad de Ciencias Agrícolas.
Circuito Universitario Gonzalo Aguirre
Beltrán S/N, Zona Universitaria.
Xalapa, Veracruz, México.

Dra. Aleana Ledezma Delgadillo

Universidad Politécnica de Nayarit Av.
Universidad 67-B, Ciudad del Valle,
C.P. 63157 Tepic, Nayarit, México.

**Dr. Héctor Alejandro Leyva
Hernández**

Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-
IPN, Unidad Sinaloa, Departamento de
Biotecnología Agrícola, Blvd. Juan de
Dios Bátiz Paredes No. 250. Guasave,
Sinaloa, México C.P. 81101

**Dra. Sayani Teresa López
Espinosa**

Tecnológico Nacional de México.
Posgrado, IT de Conkal, Conkal,
Yucatán, México.

Dr. Damián Aarón Porras Flores

Facultad de Ciencias Agrotecnológicas
de la Universidad Autónoma de
Chihuahua, México.

Dr. César Márquez Quiroz

División Académica de Ciencias
Agropecuarias. Universidad Juárez
autónoma de Tabasco. Villahermosa,
Tabasco, México.

**Ing. Miguel Bernabé Montalvo
Cruz**

Instituto Tecnológico de Villahermosa,
Villahermosa, Tabasco, México.

M.C. Amelio Eli Morales Morales

Tecnológico Nacional de México.
Posgrado, IT de Conkal, Conkal, Yucatán,
México.

M.C. Ezequiel Muñoz Márquez

Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD),
Unidad Delicias Av. Cuarta Sur 3820,
Fracc. Vencedores del Desierto,
Delicias, Chihuahua, México.

**M.C. Linda Citlalli Noperi
Mosqueda**

Facultad de Ciencias Agrotecnológicas
de la Universidad Autónoma de
Chihuahua, México.

Dra. Sandra Pérez Álvarez

Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-
IPN, Unidad Sinaloa, Departamento de
Biotecnología Agrícola, Blvd. Juan de
Dios Bátiz Paredes No. 250. Guasave,
Sinaloa, México

Dra. Ramona Pérez Leal

Facultad de Ciencias Agrotecnológicas
de la Universidad Autónoma de
Chihuahua, México.

Dr. Francisco Javier Piña Ramírez

Facultad de Ciencias Agrotecnológicas
de la Universidad Autónoma de
Chihuahua, México.

Dr. Pablo Preciado Rangel

Instituto Tecnológico de Torreón.
Carretera Torreón- San Pedro A.P. 42,
km 7.5, Torreón, Coahuila, México.

Dr. Miguel Ángel Ramírez

Arrebato

Instituto Nacional de Ciencias
Agrícolas (INCA). Carretera La Francia
km 1.5 Los Palacios Pinar del Río.
Cuba

Dr. Juan José Reyes Pérez

Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Av. Walter Andrade. Km 1.5 vía a Santo Domingo. Quevedo, Los Ríos, Ecuador.

Dra. Aida Tania Rodríguez Pedroso

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Carretera La Francia km 1.5 Los Palacios Pinar del Río, Cuba

Dr. Luis Romero Monreal

Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. Ave Fuente nueva s/n, 18071, Granada, España.

Dra. Lilia Salas Pérez

Universidad Politécnica de Gómez Palacio, Durango, México.

Dra. Nora Aidee Salas Salazar

Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, México.

Dra. Francisca Sánchez Bernal

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fe S/N. Torreón, Coahuila, México.

Dr. Esteban Sánchez Chávez

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), Unidad Delicias Av. Cuarta Sur 3820, Fracc. Vencedores del Desierto, C.P. 33089 Delicias, Chihuahua, México. esteban@ciad.mx

Dr. Juan Pedro Sida Arreola

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), Unidad Delicias Av. Cuarta Sur 3820, Fracc. Vencedores del Desierto, C.P. 33089 Delicias, Chihuahua, México.

Dra. Mayra Cristina Soto Caballero

Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, México.

Dr. Juan Manuel Soto Parra

Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, México.

Dr. Radames Trejo Valencia

Instituto Tecnológico de Minatitlán, Blvd. Institutos Tecnológicos S/N, Col. Buena Vista Norte, Minatitlán, Veracruz, México.

Dr. David Alejandro Vázquez Díaz

Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIReNa), Antigua Normal Rural de Salaises, Salaises, Chihuahua, México.

Dra. Rosa María Yañez Muñoz

Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, México.

Dr. Cirilo Vázquez Vázquez

Facultad de Agricultura y Zootecnia, Universidad Juárez del estado de Durango, Ejido Venecia, carretera Gómez Palacio Tlahualilo km 35, Durango.

Prólogo

La presente obra tiene como objetivo fundamental apoyar en el quehacer académico a los académicos, investigadores, estudiantes, asesores técnicos y productores en el área de la Nutrición Mineral de las Plantas con enfoque a la Biofortificación con micronutrientes en cultivos agrícolas. Actualmente, los seres humanos requieren más de 22 elementos minerales para su desarrollo óptimo, los cuales pueden ser suplementados con una dieta apropiada. Algunos de estos nutrientes son requeridos en grandes cantidades, pero otros, tales como hierro (Fe), zinc (Zn), cobre (Cu), yodo (I) y selenio (Se), son requeridos en cantidades pequeñas. Generalmente, estos elementos minerales son proporcionados en la cadena alimenticia a través del consumo de vegetales. Los elementos minerales más frecuentemente deficientes en las dietas humanas son Fe, Zn, I y Se. Se estima que de la población que padece malnutrición de micronutrientes, 60-80% de esa población presentan deficiencia de Fe, > 30 % son deficientes en Zn, 30% son deficientes en I y alrededor del 15% son deficientes en Se. Hoy en día, el Fe y el Zn han recibido considerable atención como micronutrientes esenciales para la alimentación de los seres humanos. La ingesta diaria recomendada de Fe y de Zn es de 10-15 $\mu\text{g}/\text{día}$ y 11 $\text{mg}/\text{día}$ para adultos respectivamente, mientras que para los niños es de 6-8 $\mu\text{g}/\text{día}$ y 3-5 $\text{mg}/\text{día}$ respectivamente. La deficiencia de Fe pudiera estar afectando a tres billones de personas en el mundo, por lo que se considera a esta deficiencia la más importante. El Fe es un importante componente en la dieta humana porque regula la actividad de diferentes enzimas y juega un papel importante en el sistema inmunológico. Además, el Fe es un importante componente de la sangre humana, ya que es el átomo central de la hemoglobina. Las deficiencias de Fe resultan en: anemia nutricional,

baja resistencia a infecciones, se reduce la capacidad de aprendizaje, se reduce el crecimiento, provoca fatiga y se reduce la productividad en el trabajo. La deficiencia de Fe afecta en particular a las mujeres en el estado reproductivo, resultando en bajo peso y talla de los recién nacidos, y altas tasas de mortalidad maternal. Con lo que respecta al Zn, éste es requerido para la actividad de más de 100 enzimas involucradas en muchas rutas metabólicas y consecuentemente es necesario para un amplio rango de funciones bioquímicas e inmunológicas. La deficiencia de Zn afecta el crecimiento físico, la competencia inmune, la función reproductiva y el desarrollo neurológico. Estas consecuencias adversas en la salud por la deficiencia de Zn varían de acuerdo con la edad. En el caso de los niños, la deficiencia de Zn se manifiesta en la baja ganancia en el crecimiento y talla del niño, presencia de diarrea, anorexia y disturbios neurológicos. Además, la deficiencia del Zn está asociada con el incremento de la morbilidad y mortalidad. Por otro lado, el Fe y Zn son constituyentes de un gran número de enzimas, algunas de las cuales tienen funciones antioxidantes. La deficiencia de estos micronutrientes en los seres humanos hace que sean susceptibles a daños por ciertos tipos de estrés oxidativo. Actualmente, una estrategia innovadora a la problemática de la desnutrición de micronutrientes en la dieta alimentaria se le ha llamado “Biofortificación”. La biofortificación ha sido definida como el proceso de incrementar las concentraciones biodisponibles de elementos esenciales en porciones comestibles de plantas cultivadas a través del manejo agronómico (fertilización) o mejoramiento genético. La fertilización se considera una estrategia promisoriosa para biofortificar con Fe y Zn a los cultivos. En el caso de México, el frijol se considera un cultivo estratégico para biofortificar con Fe y Zn, debido a que es un alimento importante de la canasta básica

ya que de este cultivo se obtiene la proteína de origen vegetal más utilizada por los diferentes estratos sociales. Por otro lado, la producción de frijol en México para 2009 fue de 1,150,000 toneladas compitiendo con países como la India, Brasil, China y Estados Unidos, países que en conjunto aportan el 63% de la producción mundial. Para asegurar que la biofortificación con Fe y Zn resulte efectiva, deben establecerse las concentraciones en las cuales el fruto de frijol pueda brindar al consumidor los niveles recomendados para evitar deficiencias.

Los nuevos retos de la agricultura es satisfacer la demanda de alimentos, sin embargo, dichos alimentos deben cumplir con la calidad nutricional suficiente para no tener deficiencias de micronutrientes. Por lo tanto, la Nutrición Mineral de las Plantas juega un papel importante a través de la biofortificación, aumentar el contenido de micronutrientes de los alimentos básicos. Hoy en día, la biofortificación agronómica con micronutrientes se considera una herramienta innovadora y prometedora.

Al presentar esta obra, nuestro deseo es aportar conocimientos nuevos en el área de la Nutrición de Mineral de las Plantas enfocado a la Biofortificación de cultivos agrícolas básicos, dado que es un área relevante en la producción de alimentos, que sin lugar a dudas, seguirá desarrollándose en los próximos años y en la que actualmente continuaremos trabajando para mejorar la calidad nutricional de las cosechas de los cultivos.

Fitobiofortificación con Zinc, propiedades antioxidantes y perfil ionómico en dos plantas hortícolas: *Lactuca sativa* y *Brassica oleracea*



Barrameda Medina, Yurema; Blasco León, Begonia; Sánchez Chávez, Esteban; Romero Monreal, Luis.

1.1 Resumen	3
1.2 Introducción	3
1.3 Materiales y Métodos	5
1.4 Resultados y Discusión	6
1.5 Conclusiones	15
1.6 Agradecimientos	16
1.7 Bibliografía	16

1

Fitobiofortificación con Zinc, propiedades antioxidantes y perfil iónómico en dos plantas hortícolas: *Lactuca sativa* y *Brassica oleracea*

Barrameda Medina, Yurema; Blasco León, Begonia; Sánchez Chávez, Esteban; Romero Monreal, Luis.

1.1 RESUMEN

La deficiencia de Zn es considerada como uno de los mayores factores de riesgo para la salud humana. En el presente estudio fue examinado el efecto de un programa de biofortificación con Zn, una solución complementaria para paliar la malnutrición, en dos plantas hortícolas, *Lactuca sativa* and *Brassica oleracea* a fin de seleccionar plantas más eficientes en el uso del Zn. La aplicación de no afecto a la biomasa, pero la concentración de malondialdehído incremento en ambas plantas. El uso eficiente del Zn incremento en concordancia con un incremento de la concentración de Zn, acumulación total de Zn (TZnA), y utilización eficiente del Zn (ZnUtE). Sin embargo, el uso eficiente del Zn fue menor en *L. sativa* que en *B. oleracea*. *L. sativa* mostro niveles menores de compuestos fenólicos, ascorbato y glutatión reducidos, y del ácido γ -aminobutírico que en *B. oleracea*. Además, ambas plantas alcanzaron elevadas concentraciones de Ca, Mg, Fe, and Mn, a partir de 20 μ M de Zn en *L. sativa* and 10-20 μ M en *B. oleracea*. Nuestros resultados indican que una aplicación de 20 μ M de Zn en *L. sativa* and 20-80 μ M de Zn in *B. oleracea* puede promover una mayor acumulación de Zn mejorando la calidad nutricional en la hoja para el consume humano. In *B. oleracea* fue observada una mayor concentración de Zn higher, TZnA, compuestos fenólicos, antioxidantes y concentración de nutrientes. En base a los resultados anteriores, en programas de biofortificación con Zn *B. oleracea* podría ser una mejor opción y una candidata más eficiente en este tipo de programas. Además, el consumo de ambas plantas podría promover una mayor ingesta de Zn, especialmente *B. oleracea*.

Palabras clave: Deficiencia de Zn, biofortificación, plantas hortícolas, uso eficiente del Zn.

1.2 INTRODUCCIÓN

Las deficiencias de micronutrientes como el zinc (Zn), hierro (Fe), yodo (I), y vitamina A generan problemas críticos en la industria y los países en vías de desarrollo, perjudicando gravemente a la salud humana y al desarrollo (Cakmak, 2002). Entre los micronutrientes, particularmente la deficiencia de Zn está ocurriendo tanto en cultivos como en humanos (Welch y Graham, 2004). De hecho, la deficiencia de Zn figura actualmente como un factor de riesgo importante para la salud humana y la causa de muerte a nivel mundial. En este sentido, más de 3.000 millones de personas en todo el mundo padecen desnutrición por micronutrientes, incluida la deficiencia de Zn (Welch y Graham, 2004; Cakmak, 2008).

En este sentido, los alimentos derivados de las plantas proporcionan una fuente importante de proteínas y minerales dietéticos, pero las concentraciones de algunos minerales, especialmente Zn, Fe, I y selenio (Se) son inherentemente bajas en las plantas (Waters y Sankaran, 2011). Por esta razón, la contribución a la salud humana a través de la fertilización con Zn de los cultivos de alimentos básicos parece ser una excelente manera de aliviar los problemas relacionados con la deficiencia de Zn en los seres humanos en todo el mundo (Cakmak, 2009). En este sentido, la concentración y acumulación de Zn en las partes comestibles de las plantas es la base para recomendar la fertilización con Zn. Recientemente, se ha propuesto una solución complementaria a la malnutrición mineral, este enfoque se conoce como biofortificación. Este término fue definido por White y Broadley (2005) como el proceso para aumentar las concentraciones biodisponibles de elementos esenciales en las partes comestibles de las plantas de cultivo mediante intervención agrícola o selección genética. Por lo tanto, existe un interés considerable en la cría de cultivos

eficientes en el uso minerales que producen altos rendimientos y acumulan minerales en suelos infértiles. Si bien esta estrategia de biofortificación todavía no se ha demostrado, tiene el potencial de ser sostenible y rentable y de llegar a poblaciones rurales remotas (Bouis *et al.*, 2011).

En la actualidad, otro aspecto de gran interés es la relación entre el consumo de frutas y verduras frescas y sus beneficios para la salud a la hora de reducir el riesgo de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Liu, 2004). Estas propiedades se han atribuido a los alimentos que son fuentes ricas en numerosos compuestos bioactivos, como los fitoquímicos con propiedades antioxidantes conocidas por promover beneficios a la salud (Cartea *et al.*, 2011; Pérez-López *et al.*, 2013). En este sentido, los principales antioxidantes de las verduras son la vitamina E, los compuestos fenólicos y especialmente los flavonoides, los carotenoides y el ascorbato (AsA). Estos antioxidantes eliminan los radicales e inhiben la iniciación o rompen la propagación de la cadena de especies reactivas del oxígeno (Podsdek, 2007). Por esta razón, los extractos crudos de frutas y verduras así como otros alimentos vegetales ricos en moléculas antioxidantes han atraído un interés creciente ya que retrasan la degradación oxidativa de los lípidos y de ese modo mejoran el valor nutricional de los alimentos (Nicolle *et al.*, 2004).

Entre las especies de plantas cultivadas, *Lactuca sativa* (familia Asteraceae) es un cultivo alimenticio importante dentro de la Unión Europea (Baslam *et al.*, 2013). La lechuga es una importante hortaliza de hoja que se consume principalmente en fresco o en mezclas de ensalada y se consume en cantidades crecientes debido a que se perciben como alimentos saludables con alto valor nutritivo (DuPont *et al.*, 2000; Pérez-López *et al.*, 2013). Los efectos

sobre la salud de la lechuga incluyen sus propiedades para reducir el colesterol (Huang, 1980) y los beneficios contra las enfermedades cardiovasculares (Serafini *et al.*, 2002; Nicolle *et al.*, 2004). Las propiedades saludables se atribuyen a un gran suministro de compuestos antioxidantes (por ejemplo, vitamina E, polifenoles, antocianinas, carotenoides, AsA) y contenido de fibra (Serafini *et al.*, 2002; Nicolle *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2010).

Otras especies de plantas extensamente cultivadas en Europa son las del Brassica. El género Brassica es el más importante dentro de la familia Brassicaceae, que incluye algunos cultivos y especies de gran importancia económica mundial como *Brassica oleracea*. Las verduras pertenecientes al género Brassica se consumen a lo largo del año como ingredientes de diferentes ensalada después de cocinar verduras crudas y congeladas (Podsdek, 2007). La popularidad y el consumo de las especies vegetales del género Brassica está aumentando debido a la contribución a la nutrición humana y otros beneficios para la salud (Salunkhe y Kadam, 1998) que las propiedades de prevención del cáncer y de enfermedades cardiovasculares (Cartea *et al.*, 2011). Estas propiedades promotoras de la salud se atribuyen a su capacidad antioxidante (carotenoides, compuestos fenólicos, antocianinas, AsA y ácido γ -aminobutírico (GABA)) (Wang *et al.*, 1996; Galati y O'Brien, 2004, Podsdek, 2007).

Hay muchos estudios sobre la biofortificación de Zn que, hasta el día de hoy, han centrado sus esfuerzos en aumentar la concentración de este elemento en cereales, legumbres y tubérculos. Sin embargo, rara vez se ha prestado atención al efecto de la suplementación con Zn en plantas hortícolas utilizadas en el consumo diario y mundial. Por lo tanto, el objetivo de nuestro trabajo fue examinar el efecto de la

biofortificación de Zn en las partes comestibles de dos vegetales de hojas diferentes para seleccionar plantas eficientes en Zn en este tipo de programas. Por esta razón, se realizó un análisis comparativo entre *Lactuca sativa* cv. Phillipus y *Brassica oleracea* cv. Bronco determinando los parámetros para mejorar el crecimiento, la capacidad antioxidante y la calidad mineral nutricional. La información proporcionada por este estudio será útil para desarrollar cultivares de *L. sativa* y *B. oleracea* con una mayor acumulación de Zn, que podría promover un contenido óptimo de fitoquímicos antioxidantes que promuevan la salud a través de la manipulación genética y los esfuerzos de mejoramiento de plantas.

1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1 Materiales vegetales y diseño experimental

Las semillas de *Lactuca sativa* y *Brassica oleracea* fueron germinadas y crecieron durante 35 días en placas celulares de 3 cm x 3 cm x 10 cm con un sustrato de mezcla de perlita. Las placas se colocaron en plataformas en un invernadero experimental ubicado en el sur de España (Granada, Santa Fe, Saliplant S.L. 37.1924105389251, -3.7381217888). Después de 35 días, las plántulas se transfirieron a una cámara de crecimiento en las siguientes condiciones ambientales controladas: humedad relativa del 50%, temperatura diurna / nocturna de 22/18 ° C, un fotoperiodo de 12/12 h con una densidad de flujo fotónico fotosintético (PPFD) de 350 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. En estas condiciones, las plantas se cultivaron en cultivo hidropónico en bandejas de polipropileno (60 cm de diámetro en la parte superior, 60 cm de diámetro en el fondo y 7 cm de altura) en un volumen de 3 l. A los 35 días después de la germinación y durante todo el experimento, las plantas control recibieron una solución de crecimiento, que estaba compuesta de 4 mM de KNO_3 , 3 mM de

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 2 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 6 mM de KH_2PO_4 , 1 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 2 μM de $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,25 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 μM de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 5 ppm de Fe-quelato (Sequestrene; 138 FeG100) y 10 μM de H_3BO_3 . Al mismo tiempo, se aplicaron tratamientos con la misma solución de crecimiento modificada con diferentes concentraciones supra óptimas de Zn (10 (plantas de control), 20, 40, 60, 80 y 100 μM de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$). Esta solución, con un pH de 5.5-6.0, fue renovada cada tres días. El diseño experimental fue un bloque aleatorio completo con 12 tratamientos dispuestos en bandejas individuales con ocho plantas por tratamiento y tres repeticiones cada una, de modo que el número total de plantas fue de 288.

1.3.2 Muestreo de plantas y peroxidación de lípidos

Se tomaron muestras de plantas de *L. sativa* y *B. oleracea* después de 21 días de crecimiento bajo estas condiciones. Las hojas comestibles de cada tratamiento se lavaron con agua destilada, se secaron sobre papel de filtro y se pesaron, obteniendo así el peso fresco (FW). La mitad de las hojas comestibles de cada tratamiento se congelaron a -30 ° C para la posterior realización de los ensayos bioquímicos y la otra mitad de los materiales de la planta se secaron en un horno de aire forzado a 70 ° C durante 24 h para obtener el peso seco (DW) y el posterior análisis de la concentración de Zn y macronutrientes y otras concentraciones de micronutrientes.

Para el ensayo del malondialdehído (MDA), se homogeneizaron 0,1 g de hojas frescas siguiendo el método descrito por Heath y Packer, 1968. La concentración de MDA se calculó usando el coeficiente de extinción del MDA de 155 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$. El resultado de MDA se expresó como $\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$.

1.3.3 Concentración de Zn y eficiencia de uso de Zn

Para la determinación de la concentración de Zn, una muestra de 0.15 g de material seco fue sometida a un proceso de mineralización por el método de Wolf (1982). El análisis mineral se realizó usando ICP-MS (X-Series II; Termo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.). La concentración de Zn se expresó como $\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$. La acumulación total de Zn (TZnA) se calculó multiplicando la concentración total de Zn (TZnC) por el DW del total de hojas comestibles (Sorgonà et al., 2006), expresándose los resultados como mg de Zn en hojas comestibles. La eficiencia de utilización del Zn (ZnUE) se calculó como el cociente entre hojas comestibles DW y TZnC (Siddiqi y Glass, 1981). Los resultados se expresaron en $\text{g}^2\text{DW mg}^{-1}\text{Zn}$.

1.3.4 Capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante total se midió utilizando la capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP) (Benzie y Strain, 1996), la capacidad antioxidante equivalente trolox (TEAC) Re et al. (1999), el efecto de eliminación de radicales libres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) Hsu et al. (2003) y N, N-dimetil-p-fenilendiamina dihidrocloruro (DMPD) Fogliano et al. (1999). Para todos los ensayos, se homogeneizaron 0,1 g de material fresco en un mortero frío con la adición de 1 ml de metanol.

1.3.5 TPC, O-dPh, PPGs, flavonoides y antocianinas

Los compuestos fenólicos totales (TPC) del material vegetal se extrajeron con metanol y se analizaron cuantitativamente en A765 con reactivo Folin-Ciocalteu (Rivero et al., 2001). Los orto-difenoles (O-dPh) se determinaron a una absorbancia de 360 nm (Johnson y Schaal, 1957; Giertych et al., 1999). Los glucósidos fenilpropanoides (PPG) se determinaron según

un método colorimétrico basado en una estimación de derivado o-dihidroxicinámico, mediante la reacción de Arnou (Gálvez et al., 2005). La concentración total de flavonoides se midió por un método colorimétrico (Kim et al., 2003) con modificaciones. Las antocianinas se determinaron según Lange et al. (1971). Las concentraciones de carotenoides totales se calcularon según Wellburn, 1994.

1.3.6 Compuestos antioxidantes

La determinación de ascorbato reducido (AsA) en extractos de hojas siguió el método de Law et al. (1983) modificado por Okamura (1980). La concentración reducida de glutatión (GSH) se estimó siguiendo el método de Anderson (1985). La concentración de GABA se estimó por el método de Zhang y Bown (1997).

1.3.7 Concentración de nutrientes

El calcio (Ca), el magnesio (Mg), el hierro (Fe) y el manganeso (Mn) se determinaron como la concentración de Zn descrita anteriormente.

1.3.8 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias entre las significancias se compararon mediante la prueba de diferencia menos significativa de Fisher (LSD). Además, para determinar si las diferentes plantas y las dosis de Zn utilizadas en el experimento influyeron significativamente en los resultados, se utilizó un ANOVA de dos vías y los significancias se compararon mediante la prueba de LSD de Fisher.

1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.1 Efecto de la aplicación de Zn en la biomasa foliar y la peroxidación lipídica

Después de 21 días en presencia de todas las concentraciones supra óptimas de Zn, la biomasa de las hojas comestibles no se vio

afectada en términos de DW en ninguna de las plantas (**Fig. 1A**). Por otro lado, en plantas de *L. sativa* la concentración de MDA aumentó solo en el tratamiento de 100 μ M (Fig. 1B, $p < 0.01$), mientras que en *B. oleracea* este indicador de peroxidación aumentó a partir de la dosis de 20 μ M y fue más pronunciado en el tratamiento de 100 μ M (**Fig. 1B**, $p < 0.001$). La Fig. 1B muestra que, independientemente de los tratamientos, *B. oleracea* acumuló una mayor concentración de MDA que *L. sativa* para todos los tratamientos con respecto a las plantas de control (10 μ M de Zn).

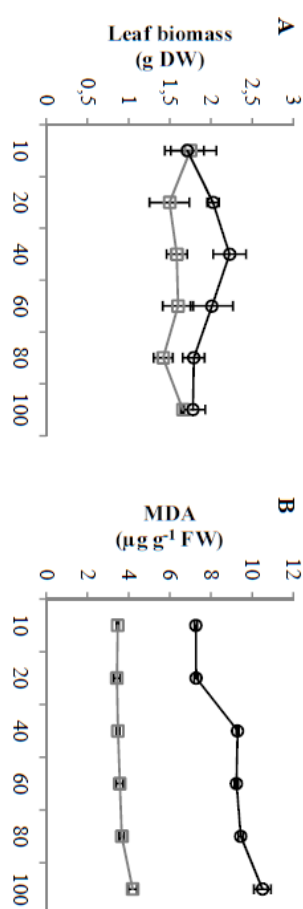


Figura 1 • Efecto de la suplementación con Zn sobre la biomasa foliar (peso seco (DW)) y la concentración de malondialdehído (MDA) en la parte comestible de las plantas de *L. sativa* y *B. oleracea*. Los valores son las medias ($n = 9$) y las diferencias entre las medias se compararon mediante la prueba de Fisher de la diferencia menos significativa (LSD, $p = 0.05$).

Uno de los factores limitantes en los programas de biofortificación con oligoelementos, basado en la aplicación de dosis crecientes de este elemento, es evitar alcanzar la fitotoxicidad. En consecuencia, bajo la toxicidad de Zn, algunos de los indicadores de estrés más confiables y ampliamente utilizados son la biomasa vegetal y la peroxidación lipídica, expresada como concentración de MDA (Barrameda-Medina et al., 2014). En nuestro estudio, esto se demostró como un aumento de Zn en la solución de nutrientes, pero no implicó una alteración del crecimiento en las dos especies objetivo de estudio (**Fig. 1A**). Similar a nuestros resultados, algunos estudios han demostrado que bajo programas de biofortificación con diferentes elementos, la biomasa de la parte comestible se mantiene (en términos de DW) en plantas de lechuga y coliflor (White y Broadley 2005; Müller, 2013; Mao et al., 2014; D'Imperio et al., 2015; Lawson et al., 2015). Sin embargo, la concentración de MDA aumentó, alcanzando niveles altos de hasta el 21% en *L. sativa* y el 44% en *B. oleracea* cuando se aplicó una dosis de 100 μ M (**Fig. 1B**). En este sentido, una mayor concentración de MDA es indicativa de estrés en la planta. Sin embargo, en este estudio, una mayor concentración de MDA no se correlacionó con una menor producción concomitante de la parte comestible en ninguna de las plantas (**Fig. 1A** y **Fig. 1B**), probablemente debido a que los niveles de este compuesto no fueron lo suficientemente altos como para causar daños graves en ambas plantas.

En los cultivos comestibles, una mayor densidad de micronutrientes (o biofortificación), incluido el Zn, podría mejorar en gran medida la nutrición humana a escala mundial (Waters y Sankaran, 2011; White y Broadley, 2011). En este sentido, las estrategias de biofortificación incluyen la aplicación de fertilizantes de Zn y el desarrollo de genotipos de cultivos que

adquieren más Zn del suelo y lo acumulan en las partes comestibles (White y Broadley, 2011). En base a nuestros resultados, una aplicación de Zn en el rango de 10-100 μM resultó suficiente para promover el normal crecimiento de la planta ya que no hubo cambios en la biomasa de la parte comestible con la aplicación de diferentes dosis de Zn (**Fig. 1A**). Sin embargo, la concentración de Zn se vio incrementada al aumentar la dosis de Zn en ambas especies (**Fig. 2A**). De forma similar a nuestros resultados, White y Broadley (2011) han demostrado que la concentración de Zn en hojas, tallos y raíces puede aumentarse mediante la aplicación de fertilizantes de Zn. Además, la concentración foliar de Zn en un rango de 100-700 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW (y quizás más) puede ser lograda sin pérdidas de rendimiento en cultivos tolerantes al Zn cuando se aplican fertilizantes de Zn al suelo (Fageria, 2009). En el presente estudio, al aumentar la dosis de Zn aplicada a la solución, ambas plantas mostraron un aumento en la concentración de este elemento en la parte comestible y las concentraciones mayores de Zn difirieron mucho en ambas plantas (**Fig. 2A**). Similar a nuestros resultados, numerosos hallazgos en programas de biofortificación han demostrado que la concentración de los elementos aplicados, incluido el Zn, varía mucho entre diferentes cultivos comestibles (White y Broadley, 2011; Müller, 2013; Weng et al., 2013).

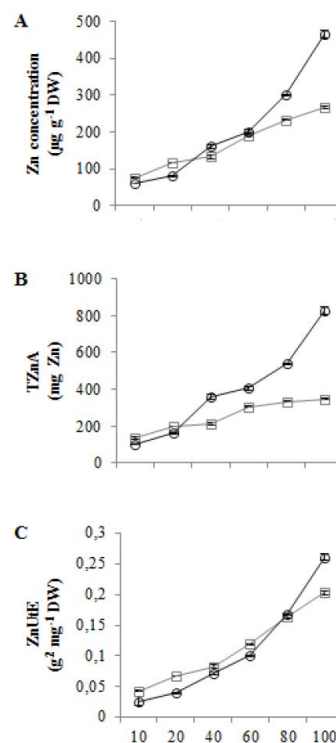


Figura 2 • La concentración de Zn y la eficiencia de uso de Zn en la parte comestible de *L. sativa* (\square) y *B. oleracea* (\circ). Concentración de Zn, acumulación de Zn (TZnA) y eficiencia de utilización de Zn (ZnUtE). Los valores son las medias ($n = 9$) y las diferencias entre las medias se compararon mediante la prueba de Fisher de la diferencia menos significativa (LSD, $p = 0.05$).

1.4.2 Concentración de Zn y eficiencia en el uso de Zn

La concentración de Zn, TZnA y ZnUtE aumentó para todos los tratamientos en ambas especies de plantas, siendo más pronunciada con la dosis de 100 μM de Zn con respecto a las plantas control (**Fig. 2A**, $p < 0.001$, **Fig. 2B**, $p < 0.001$, **Fig. 2C**, $p < 0.001$). Independientemente de los tratamientos con Zn, *B. oleracea* registró una mayor concentración de Zn, TZnA y ZnUtE (**Fig. 2**).

La eficiencia del Zn es la capacidad de las plantas para mantener el crecimiento y el rendimiento. En este sentido, Rengel y Graham (1995) sugirieron que la ZnUtE debería considerarse un mecanismo potencial de Zn. En nuestro trabajo, aunque la ZnUtE aumentó en ambas plantas (**Fig. 2C**), en *L. sativa* se registró

un aumento de hasta un 371%, mientras que en *B. oleracea* aumentó hasta un 889% en el tratamiento de 100 μM con respecto a sus respectivas plantas de control (**Fig. 2C**). Nuestros resultados son consistentes con los de estudios previos en los que se demostró que especies como la coliflor, lechuga y espinaca son los cultivos más eficientes en programas de biofortificación con varios elementos (Müller, 2013). Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, los estudios sobre programas de biofortificación con I, han demostrado que un aumento en este elemento produjo una mayor concentración de I en lechuga y coliflor, pero los valores más altos fueron obtenidos en las partes comestibles de Brassica, definiendo a este cultivar como el más efectivo en este tipo de programas (Hong et al., 2008, Lawson et al., 2015). También se debe tener en cuenta que entre las dos plantas experimentales objeto de estudio *B. oleracea* se mostró como una mejor candidata para los programas de biofortificación con Zn, dada su mayor concentración de Zn y TZnA, así como el mantenimiento de la biomasa de la parte comestible. Resultados similares fueron obtenidos por Mao et al. (2014) en un programa de biofortificación con Zn en Brassica rapa, pero la concentración de este elemento ($35 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$) fue significativamente menor que la encontrada en el presente estudio. En este sentido, podemos confirmar que *B. oleracea* tiene un enorme potencial para acumular Zn en su parte comestible en comparación con otras especies de Brassica.

1.4.3 Capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante total mostró un patrón similar en ambas especies, con valores inferiores de FRAP para todos los tratamientos en comparación con sus respectivos tratamientos control (**Cuadro 1**). En nuestro estudio, los niveles de TEAC difirieron en ambas plantas (**Cuadro 1**). Este parámetro disminuyó significativamente en las plantas de *L. sativa*

para todos los tratamientos con respecto al control (**Cuadro 1**), mientras que en *B. oleracea* la prueba TEAC no se vio afectada negativamente en comparación con el control (**Cuadro 1**). La prueba de DPPH indicó una disminución marcada para todos los tratamientos en ambas plantas con respecto al control (**Cuadro 1**). Finalmente, la prueba DMPD mostró un patrón similar en las dos plantas (**Cuadro 1**). Excepcionalmente, observamos un aumento en el valor de la prueba DMPD en plantas de *L. sativa* cultivadas bajo la dosis de 20 μM (**Cuadro 1**). Sin embargo, la respuesta de ambas plantas con respecto a los diferentes métodos específicos difirió significativamente. Independientemente de la concentración de Zn en la solución nutritiva, fueron hallados los valores más altos en las pruebas TEAC y DMPD en *L. sativa*, mientras que en *B. oleracea* los valores más altos se obtuvieron en las pruebas FRAP y DPPH (**Cuadro 1**).

Los estudios epidemiológicos sugieren la importancia del alto consumo de productos vegetales secundarios distribuidos en vegetales y frutas para prevenir o mejorar algunas enfermedades crónicas comunes (Kinsella et al., 1993). Estas sustancias poseen un alto potencial antioxidante y son equivalentes al estrés oxidativo (Schlesier et al., 2002). En este sentido, han sido descritos diversos métodos en la literatura para medir la capacidad antioxidante total: FRAP, TEAC, DPPH y DMPD (Sharma et al., 2008). En el presente estudio, los datos revelaron diferencias significativas entre las diferentes aplicaciones de Zn en comparación con las plantas control para la mayoría de las pruebas evaluadas (**Cuadro 1**). Estos resultados sugieren que las pruebas FRAP, DPPH, y especialmente TEAC, podrían estar fuertemente relacionadas con la actividad antioxidante total en *B. oleracea* con el consiguiente aumento en la concentración de Zn sin afectar la biomasa de la parte comestible, mientras que en *L. sativa* los

valores de DMPD podrían indicar que bajo 20 μM de Zn esta planta podría promover mayores concentraciones de compuestos antioxidantes (Cuadro 1). Además, según nuestros resultados, una dosis superior a 100 μM podría reducir la capacidad antioxidante total en ambas plantas (Cuadro 1).

Cuadro 1 • Prueba de respuesta de diferentes antioxidantes en la parte comestible de las plantas de *L. sativa* y *B. oleracea* sometidas a diferentes aplicaciones de Zn: capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP), la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC), 2,2-difenil-1- Efecto captador de radicales libres picrylhydrazyl (DPPH) y dihidrocloruro de N, N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD).

1.4.4 PC, O-dPh, PPG, flavonoides y antocianinas

La Fig. 3A muestra que, en *L. sativa*, los TPC aumentaron significativamente en los tratamientos 20 y 40 μM de Zn con respecto al control ($p < 0,001$), mientras que en plantas de

	FRAP (mg g^{-1} PF)	TEAC (mg g^{-1} PF)	DPPH (% g^{-1})	DMPD (Capacidad antioxidante equivalente en Trolox)
<i>Lactuca sativa</i>				
cv. Phillipus				
10 μM Zn	1.40 \pm 0.02a	6.57 \pm 0.02a	248.44 \pm 6.25a	39.70 \pm 0.57b
20 μM Zn	1.34 \pm 0.02a	6.36 \pm 0.03c	226.97 \pm 7.82b	41.75 \pm 0.56a
40 μM Zn	1.33 \pm 0.10ab	6.38 \pm 0.01c	202.04 \pm 3.89c	39.87 \pm 0.40ab
60 μM Zn	1.22 \pm 0.00b	6.38 \pm 0.01c	198.50 \pm 5.22c	31.25 \pm 1.16d
80 μM Zn	0.64 \pm 0.00c	6.38 \pm 0.01c	181.76 \pm 5.61d	33.13 \pm 0.57cd
100 μM Zn	0.59 \pm 0.02c	6.47 \pm 0.00b	180.86 \pm 4.23d	33.30 \pm 0.61c
<i>p</i> -Value	***	***	***	***
LSD _{0.05}	0.12	0.05	16.14	1.97
<i>Brassica oleracea</i>				
cv. Bronco				
10 μM Zn	1.63 \pm 0.01a	6.33 \pm 0.01ab	270.82 \pm 2.79a	26.10 \pm 1.17ab
20 μM Zn	1.45 \pm 0.02b	6.34 \pm 0.02a	244.54 \pm 2.37b	22.59 \pm 0.22cd
40 μM Zn	1.23 \pm 0.06c	6.31 \pm 0.01ab	239.89 \pm 3.92b	24.98 \pm 1.06bc
60 μM Zn	1.13 \pm 0.01d	6.30 \pm 0.01b	243.64 \pm 5.92b	27.81 \pm 1.19a
80 μM Zn	1.20 \pm 0.01cd	6.30 \pm 0.02b	240.71 \pm 11.49b	22.39 \pm 0.81d
100 μM Zn	1.04 \pm 0.02e	6.29 \pm 0.00b	232.44 \pm 1.78b	19.44 \pm 0.49e
<i>p</i> -Value	***	NS	***	***
LSD _{0.05}	0.08	0.04	15.38	2.58
Análisis de varianza				
Plants (<i>P</i>)	***	***	***	***
Doses (<i>D</i>)	***	***	***	***
<i>P</i> x <i>D</i>	***	***	**	***

Los niveles de significancia están representados por $p > 0.05$. ns, no significativo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Los medios seguidos por la misma letra no difieren significativamente.

B. oleracea con 60 μM de Zn sólo se observó un aumento respecto a 10 μM ($p < 0.001$). Además, ambas plantas disminuyeron en los niveles de TPC en el tratamiento de 100 μM con respecto a las plantas control (**Fig. 3A**, $p < 0.001$). De manera similar, la concentración de O-dPh y PPG disminuyeron, alcanzando los valores más bajos a dosis más altas de Zn en ambas plantas en comparación con los controles (**Fig. 3B**, $p < 0.001$ y **Fig. 3C**, $p < 0.001$). En *L. sativa* se observó un aumento en la concentración de flavonoides cuando la dosis aplicada fue de 20 μM , mientras que su concentración disminuyó significativamente con los tratamientos más altos (80-100 μM) con respecto a 10 μM (**Fig. 3D**, $p < 0.001$). En *B. oleracea*, la concentración de flavonoides se mantuvo en un rango de 40-80 μM , pero disminuyó en los tratamientos de 20 y 100 μM en comparación con las plantas control (**Fig. 3D**, $p < 0.001$). Además, en ambas plantas los valores más bajos resultaron del tratamiento de 100 μM (**Fig. 3D**). En cuanto a las

antocianinas, mientras que en *L. sativa* la concentración de antocianinas disminuyeron en los dosis más altas a partir de 40 μM (**Fig. 3E**, $p < 0.001$), en *B. oleracea* un aumento de este compuesto fueron registrados en los tratamientos de 20, 80, y 100 μM con respecto a las plantas control (**Fig. 3E**, $p < 0.001$). Finalmente, en *L. sativa*, aumentó la suplementación de Zn provocó una disminución gradual en la concentración de carotenoides, a excepción del tratamiento de 40 μM , con respecto al control (**Fig. 3F**, $p < 0.001$), mientras que en *B. oleracea* la concentración disminuyó en todos los tratamientos, alcanzando el nivel más bajo a una dosis de 60 μM (**Fig. 3F**, $p < 0.001$). En general, independientemente de todas las dosis de Zn proporcionadas, *B. oleracea* mostró mayores concentraciones de todos los compuestos (TPC, O-dPh, PPG, flavonoides y antocianinas) que los obtenidos en *L. sativa* (Fig. 3).

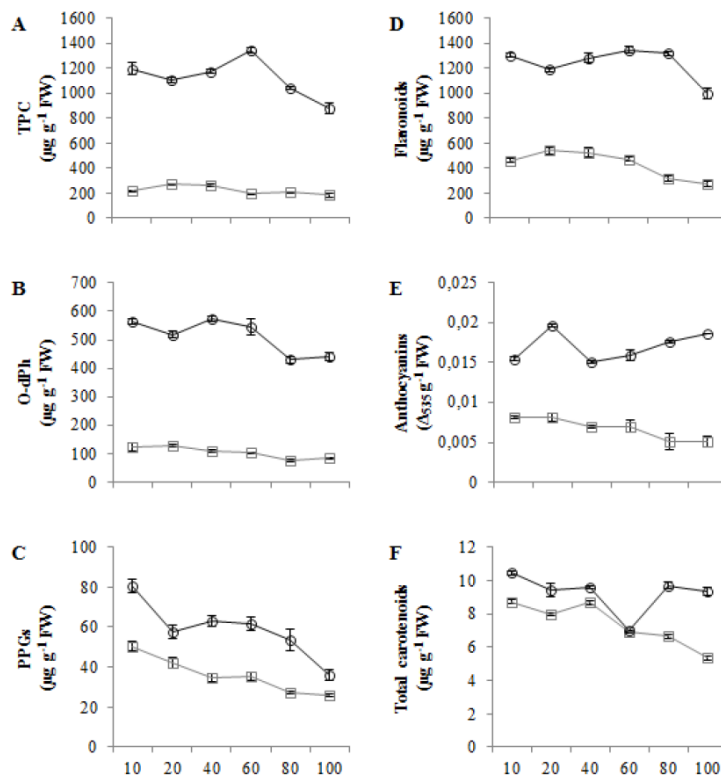


Figura 3 • Efecto de la aplicación de Zn en compuestos fenólicos y pigmentos en la parte comestible de *L. sativa* (□) y *B. oleracea* (○). Compuestos fenólicos totales (TNC), ortodifenoles (OdPh) glucósidos fenilpropanoides (PPG) y

concentración de pigmentos: flavonoides, antocianinas y carotenoides totales. Los valores son las medias ($n = 9$) y las diferencias entre las medias se compararon mediante la prueba de Fisher de la diferencia menos significativa (LSD, $p = 0.05$).

El interés en el papel de los antioxidantes eliminadores de radicales libres en la salud humana ha impulsado a la investigación en los campos de la horticultura y la ciencia de los alimentos para evaluar los antioxidantes en vegetales y frutas (Singh et al., 2006). Además, existe una evidencia creciente que indica los efectos aditivos y sinérgicos de los compuestos antioxidantes de las verduras y frutas en la salud humana, ya que pueden disminuir el riesgo de muchas patologías relacionadas con el estrés oxidativo (Blasco et al., 2008). Entre los fitoquímicos, los compuestos fenólicos, un grupo extenso con una amplia gama de estructuras químicas, son los más importantes (Blasco et al., 2008). Los resultados de nuestro trabajo muestran diferencias significativas en la concentración de TPC y para diferentes tratamientos con Zn en plantas (**Fig. 3A**). Sin embargo, en ambas plantas la concentración de TPC, O-dPh y PPG disminuyó en comparación con sus respectivas plantas de control, siendo más pronunciada cuando los tratamientos aplicados fueron de 80 μM y 100 μM con respecto a 10 μM (**Figuras 3A-3C**). Otro grupo de compuestos antioxidantes de gran importancia incluye los flavonoides, que exhiben muchas funciones biológicas tales como actividades antialérgicas, antitumorales, antivirales y antioxidantes. Aunque generalmente se encuentran en bajas cantidades en frutas y verduras, pueden tener altas tasas de actividad antioxidante (Shahidi et al., 1992). En este caso, las partes comestibles de ambas plantas nuevamente mostraron diferencias significativas en la concentración de flavonoides con respecto al control (**Fig. 3D**), lo que indica que solo una aplicación de 20 μM aumentó la concentración de flavonoides en *L. sativa* en comparación con la dosis basal (**Fig. 3D**) mientras que en *B. oleracea*, los tratamientos en

un rango de 40-80 μM fueron suficientes para mantener los valores altos de estos compuestos antioxidantes (**Fig. 3D**). Por otro lado, las antocianinas constituyen uno de los grupos más grandes e importantes de pigmentos hidrosolubles en la mayoría de las especies en el reino vegetal (Nie et al., 2013). Son compuestos sensibles al estrés, pero también son fitonutrientes importantes para una dieta saludable (De Pascual-Teresa et al., 2010). Los resultados de nuestro estudio mostraron diferencias significativas en ambas plantas cultivadas con diferentes aplicaciones de Zn (**Fig. 3E**). Finalmente, los carotenoides son pigmentos lipofílicos naturales que se encuentran en alimentos a base de plantas. Los carotenoides proporcionan color y una fuente de vitamina A, y son un componente de los procesos metabólicos biológicos (Thavarajah y Thavarajah, 2012). En general, en *L. sativa* y *B. oleracea* la concentración de carotenoides disminuyó cuando la dosis de Zn aumentó en el medio de cultivo en comparación con sus respectivos controles, pero esta disminución fue más pronunciada en las plantas de *L. sativa* (**Fig. 3F**).

1.4.5 Compuestos antioxidantes

En el presente estudio, el AsA reducido disminuyó para todas las aplicaciones de Zn en *L. sativa* en comparación con las plantas de control (10 μM de Zn) (**Fig. 4A**, $p < 0.001$). La concentración de AsA se redujo solo con el tratamiento de 80 μM de Zn, pero aumentó significativamente en los tratamientos de 20 y 100 μM en *B. oleracea* (**Fig. 4A**, $p < 0.001$). La concentración de GSH reducido se vio afectada negativamente para la dosis de 40 μM en *L. sativa* (**Figura 4B**, $p < 0.001$), mientras que en *B. oleracea* la concentración de este compuesto antioxidante aumentó significativamente para

todos los tratamientos en comparación con las plantas control (**Fig. 4B**, $p < 0.001$). Finalmente, en plantas de *L. sativa*, el GABA aumentó a una concentración de 80 μM (**Fig. 4C**, $p < 0.001$). Sin embargo, en plantas de *B. oleracea* este compuesto disminuyó, con el valor más bajo registrado con la dosis de 100 μM de Zn en comparación con el control (**Fig. 4C**, $p < 0.001$). Independientemente de las dosis de Zn utilizadas en este estudio, *B. oleracea* mostró una mayor concentración de compuestos antioxidantes que *L. sativa* (**Fig. 4**).

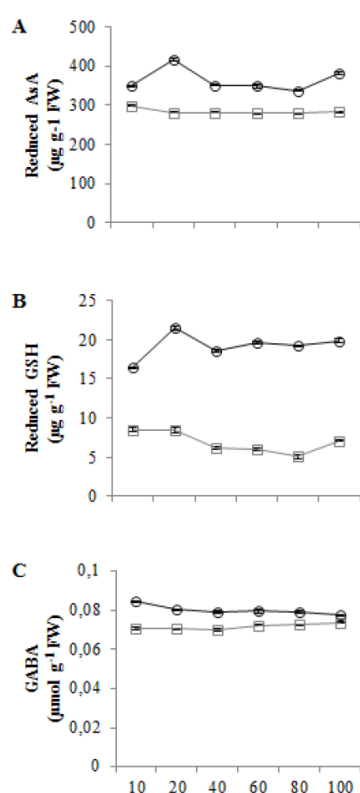


Figura 4 • Concentración de antioxidantes bajo diferentes concentraciones de Zn en la parte comestible de *L. sativa* (□) y *B. oleracea* (○). Ascorbato reducido (AsA), glutación reducida (GSH) y ácido γ -aminobutírico (GABA). Los valores son las medias ($n = 9$) y las diferencias entre las medias se compararon mediante la prueba de Fisher de la diferencia menos significativa (LSD, $p = 0.05$).

AsA es un antioxidante especialmente importante en la dieta, el cual disminuye significativamente el efecto adverso de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) que

pueden causar daño oxidativo a macromoléculas involucradas en enfermedades crónicas (Halliwell y Gutteridge, 1999). Además, el GSH reducido es un compuesto crucial para la eliminación efectiva de ROS y para el mantenimiento de otros antioxidantes como AsA y tocoferol (Yadav et al., 2005). Finalmente, en las plantas, el GABA podría desempeñar numerosas funciones, es decir, osmoregulación, protección contra el estrés oxidativo, molécula señal, etcétera. (Bouché y Fromm, 2004). En nuestro estudio, la concentración de compuestos antioxidantes se vio afectada a la inversa en ambas plantas después de la aplicación de diferentes dosis de Zn (**Fig. 4A-C**). Cabe señalar que algunos estudios han informado que los niveles de GABA en los tejidos de las plantas son bajos normalmente, que van de 0,03 a 2,00 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW (Shelp et al., 1999), pero el nivel máximo fue encontrado en plantas sometidas a diferentes tipos de estrés, incluida la toxicidad de Zn (Paradise et al., 2015). En nuestras plantas, encontramos valores de 0.07-0.085 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW (**Fig. 4C**), lo que indica que ninguna de las dosis de Zn fueron fitotóxicas en ninguna de las plantas. Sin embargo, en *L. sativa* los valores fueron en todos los casos inferiores a los encontrados en *B. oleracea* (**Fig. 4C**). De hecho, GABA ha sido identificado solo en frijoles, espinacas, papas, col rizada (Oh et al., 2003) y recientemente, en coliflor (Park et al., 2014).

1.4.6 Concentración de nutrientes

En general, se encontraron diferencias en ambas plantas con respecto a la interacción de Zn con las concentraciones de macronutrientes y de micronutrientes en los diferentes tratamientos en comparación con las plantas de control (**Cuadro 2**). En *L. sativa* la concentración de Ca y Mn se vio aumentada cuando la dosis de Zn aplicada fue de 20 μM , mientras que esta concentración disminuyó con 40 μM en comparación con la dosis de Zn basal (10 μM de Zn) (**Cuadro 2**).

Sin embargo, en *B. oleracea* las concentraciones de Ca y Mn disminuyeron significativamente, alcanzando los valores más bajos en los tratamientos de 40 y 60 μM , respectivamente, en comparación con el tratamiento de 10 μM (**Cuadro 2**). Por otro lado, en *L. sativa* las concentraciones de Mg y Fe mostraron un marcado incremento en los tratamientos de 20 y 100 μM , pero cuando la dosis aplicada fue 80 μM el efecto negativo fue más fuerte que en las plantas de control (**Cuadro 2**). Sin embargo, *B. oleracea* mostró un marcado incremento en la concentración de Mg con 20 μM , mientras que la concentración de Fe no se vio afectada en ninguna de las dosis aplicadas con respecto a la dosis basal (**Cuadro 2**). Finalmente, independientemente del tratamiento con Zn, *B. oleracea* mostró concentraciones mayores para todos los nutrientes estudiados, excepto en la concentración de Fe (**Cuadro 2**).

Cuadro 2 • Efecto de la suplementación con Zn sobre la concentración de nutrientes en la parte comestible de las plantas de *L. sativa* y *B. oleracea*. Calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe) y manganeso (Mn).

	Ca (mg g ⁻¹ PS)	Mg (mg g ⁻¹ PS)	Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)
<i>Lactuca sativa</i>				
<i>cv. Phillipus</i>				
10 μM Zn	7.61 \pm 0.19c	4.84 \pm 0.13b	91.45 \pm 3.50b	53.55 \pm 0.75d
20 μM Zn	8.62 \pm 0.06a	5.41 \pm 0.07a	118.27 \pm 5.19a	64.11 \pm 0.59a
40 μM Zn	7.16 \pm 0.03d	4.69 \pm 0.02b	76.45 \pm 1.19c	50.38 \pm 0.56e
60 μM Zn	8.23 \pm 0.11b	4.88 \pm 0.01b	76.85 \pm 4.81c	56.48 \pm 0.41c
80 μM Zn	7.99 \pm 0.05b	4.40 \pm 0.04c	72.74 \pm 0.74c	54.06 \pm 0.33d
100 μM Zn	8.54 \pm 0.08a	5.38 \pm 0.07a	112.03 \pm 6.86a	61.59 \pm 0.59b
p-Value	***	***	***	***
LSD _{0.05}	0.31	0.22	13.26	1.71
<i>Brassica oleracea</i>				
<i>cv. Bronco</i>				
10 μM Zn	32.53 \pm 0.33a	10.39 \pm 0.11bc	56.42 \pm 15.03b	94.97 \pm 0.73a
20 μM Zn	29.27 \pm 0.43b	11.81 \pm 135.40a	67.21 \pm 1.92b	86.21 \pm 1.07b
40 μM Zn	25.87 \pm 0.91cd	10.32 \pm 0.41bc	67.48 \pm 3.19ab	77.03 \pm 2.80c
60 μM Zn	24.63 \pm 0.44d	10.13 \pm 0.17c	61.56 \pm 4.60b	78.31 \pm 1.50c
80 μM Zn	27.72 \pm 1.22bc	10.94 \pm 0.37b	93.48 \pm 12.76a	77.46 \pm 2.15c
100 μM Zn	27.75 \pm 0.62bc	9.92 \pm 0.20c	56.22 \pm 3.11b	80.77 \pm 1.61bc
p-Value	***	**	NS	***
LSD _{0.05}	2.25	0.80	26.18	5.48
Análisis de Varianza				
Plants (P)	***	***	***	***
Doses (D)	***	***	**	***
P x D	***	***	***	***

Los niveles de significancia están representados por p > 0.05. ns, no significativo. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001. Los medios seguidos por la misma letra no difieren significativamente.

Las especies vegetales difieren mucho en términos de las concentraciones de nutrientes en sus partes comestibles (Müller, 2013; D'Imperio et al., 2015), pero se ha prestado muy poca atención a la calidad mineral nutricional y las concentraciones de Zn en las partes comestibles de la planta (Cakmak, 2009). Además, White y Broadley (2009) demostraron que las concentraciones de algunos elementos minerales a menudo son mayores en hortalizas de hoja que en cultivos de semillas, frutas o tubérculos. Sin embargo, el suministro de un nutriente puede afectar la absorción y la utilización de otros nutrientes en las plantas de cultivo (Müller, 2013; D'Imperio et al., 2015). Entre otros elementos minerales, el Ca, Mg, Fe y Mn son críticos para la salud humana. Con respecto al efecto de la ingesta supra óptima de Zn sobre las concentraciones de Ca, los datos para la concentración foliar de Ca mostraron un efecto sinérgico para todos los tratamientos con Zn en *L. sativa* (excepto 40 μM), los valores más altos aparecieron con la dosis de Zn de 20 μM (**Cuadro 2**). Sin embargo, los valores de este macronutriente disminuyeron para todos los tratamientos en *B. oleracea* (**Cuadro 2**). A pesar de la respuesta diferencial encontrada en ambas plantas, los valores en *L. sativa* fueron dos veces más bajos que en *B. oleracea* en las mismas condiciones de crecimiento (**Cuadro 2**). Al igual que Ca, otros de los elementos del grupo II más abundantes tanto en plantas como en animales es el Mg (Broadley et al., 2008). En nuestro estudio, la concentración de Mg incremento cuando la dosis aplicada fue de 20 μM en ambas plantas (**Cuadro 2**), aunque los valores encontrados fueron el doble en *B. oleracea* en comparación con *L. sativa* para todos los tratamientos. De forma similar a nuestros resultados, los hallazgos en una revisión de White y Broadley (2009) mostraron que Brassicaceae tiene valores de Ca y Mg más altos que los encontrados en otras especies. Al igual que Zn, la deficiencia de Fe es crítica en

los países en vías de desarrollo industrializados, lo que resulta en graves deficiencias de la salud humana y el desarrollo (Cakmak, 2002). En nuestro estudio, el efecto supra óptimo del Zn sobre la concentración de Fe fue positivo cuando la dosis aplicada fue de 20 μM en *L. sativa* (**Cuadro 2**). En este caso, la concentración de Fe lograda con biofortificación de Zn fue mayor en *L. sativa* que en *B. oleracea*, tal vez porque en *B. oleracea* las concentraciones de Zn fueron mucho más elevadas y podrían interferir con la concentración de Fe. Estos resultados están en concordancia con los resultados obtenidos por Sagardoy et al. (2009) donde un aumento de la concentración de Zn en hojas de Beta vulgaris promovió una disminución de la concentración de Fe. Finalmente, la deficiencia de Mn, aunque es menos frecuente que la deficiencia de Fe y Zn, también puede conducir a problemas graves de la salud, como los defectos de nacimiento (Bashir et al., 2013). La adición de oligoelementos puede afectar la absorción de varios nutrientes esenciales de la planta. Sin embargo, los resultados obtenidos en diversos programas de biofortificación de plantas hortícolas variaron enormemente. Mao et al. (2014) mostraron como una aplicación de Zn, I o Se, no afectó positivamente la concentración de macro o micronutrientes, incluso en el género de Brassica. Además, en un biofortificación con Si autores demostraron que la adición de este elemento no promovía cambios en la concentración de Ca o Mg (D'Imperio et al., 2015).

1.5 CONCLUSIONES

En este estudio, demostramos que las plantas hortícolas aumentan su eficiencia con los programas de biofortificación de Zn y que en estas dos especies hortícolas no es necesario aplicar concentraciones excesivas de Zn para mantener el crecimiento normal de ambos cultivos. Sobre

la base de nuestros resultados, la aplicación de 20 μM de Zn en *L. sativa* y 20-80 μM de Zn en *B. oleracea* refuerza la calidad mineral nutricional de estas especies. Además, *B. oleracea* registró valores más altos para la concentración de Zn; parámetros de eficiencia tales como TZnA, compuestos fenólicos (TPC, O-dPh, PPG, flavonoides y antocianinas); compuestos antioxidantes (AsA y GSH reducidos, y GABA) y concentraciones de nutrientes (Ca, Mg y Mn). Debido a los resultados anteriores, *B. oleracea* podría ser una mejor opción y un candidato más eficiente en los programas de biofortificación con Zn. Por esta razón, un consumo de ambas plantas podría mejorar una mayor ingesta de Zn en humanos, especialmente *B. oleracea*.

1.6 AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el programa PAI (Plan Andaluz de Investigación, Grupo de Investigación AGR161).

1.7 BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, M.E.**, 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology* 113, 548–555.
- Barrameda-Medina, Y., Montesinos-Pereira D., Romero, L., Blasco, B., Ruiz, J.M.**, 2014. Role of GSH homeostasis under Zn toxicity in plants with different Zn tolerance. *Plant Science* 227, 110–121.
- Bashir, K., Takahashi, R., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K.**, 2013. The road to micronutrient biofortification of rice: progress and prospects. *Frontiers in Plant Science* 4, 15. doi: 10.3389/fpls.2013.00015.
- Baslam, M., Morales, F., Garmendia, I., Goicoechea, N.**, 2013. Nutritional quality of outer and inner leaves of green and red pigmented lettuces (*Lactuca sativa* L.) consumed as salads. *Scientia Horticulturae* 151, 103–111.
- Benzie, I.F., Strain, J.J.**, 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239, 70–76.
- Blasco, B., Rios, J.J., Cervilla, L.M., Sánchez-Rodríguez, E., Ruiz, J.M., Romero, L.**, 2008. Iodine biofortification and antioxidant capacity of lettuce: potential benefits for cultivation and human health. *Annals of Applied Biology* 152, 289–299.
- Bouché, N., Fromm, H.**, 2004. GABA in plants: just a metabolite?. *Trends in Plant Science* 9, 110–115.
- Bouis, H.E., Hotz, C., McClafferty, B., Meenakshi, J.V., Pfeiffer, W.H.**, 2011. Biofortification: a new tool to reduce micronutrient malnutrition. *Food and Nutrition Bulletin* 32, S31–40.
- Broadley, M.R., Hammond, J.P., King, G.J., Astley, D., Bowen, H.C., Meacham, M.C., Mead, A., Pink, D.A.C., Teakle, G.R., Hayden, R.M., Spracklen, W.P., White,**

- P.J.**, 2008 Shoot calcium and magnesium concentrations differ between subtaxa, are highly heritable, and associate with potentially pleiotropic loci in *Brassica oleracea*. *Plant Physiology* 146, 1707–1720.
- Cakmak, I.**, 2002. Plant nutrition research: Priorities to meet human needs for food in sustainable ways. *Plant and Soil* 247, 3–24.
- Cakmak, I.**, 2008. Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification? *Plant and Soil* 302, 1–17.
- Cakmak, I.**, 2009. Enrichment of fertilizers with zinc: An excellent investment for humanity and crop production in India. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 23, 281–289.
- Cartea, M.E., Francisco, M., Soengas, P., Velasco, P.**, 2011. Phenolic Compounds in *Brassica* Vegetables. *Molecules* 16, 251–280.
- D' Imperio, M., Renna, M., Cardinali, A., Buttaro, D., Santamaria, P., Serio, F.**, 2015. Silicon biofortification of leafy vegetables and its bioaccessibility in the edible parts. *Journal of Science of Food and Agriculture*. doi: 10.1002/jsfa.7142.
- De Pascual-Teresa, S., Moreno, D.A., García-Viguera, C.**, 2010. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. *International Journal of Molecular Science* 11, 1679–1703.
- DuPont, M.S., Mondin, Z., Williamson, G., Price, K.R.**, 2000. Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of Lettuce and Endive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3957–3964.
- Fageria, N.K.**, 2009. *The use of nutrients in crop plants*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. pp. 430.
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A.**, 1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1035–1040.
- Galati, G., O'Brien, P.J.**, 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine* 37, 287–303.
- Gálvez, M., Martín-Cordero, C., Houghton, P.J., Ayuso, M.J.**, 2005. Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1927–1933.
- Giertych, M.J., Karolewski, P., De Temmerman, L.O.**, 1999. Foliage age and pollution alter content of phenolic compounds and chemical elements in *Pinus nigra* needles. *Water Air and Soil Pollution* 110, 363–377.
- Graham, R.D., Welch, R.M., Bouis, H. E.**, 2001. Addressing micronutrient malnutrition through enhancing the nutritional quality of staple foods: principles, perspectives and knowledge gaps. *Advances in Agronomy* 70, 77–142.
- Heath, R.L., Packer, L.**, 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125, 189–198.
- Hong, C-L., Weng, H-X., Qin, Y-C., Yan, A-L., Xie, L-L.**, 2008. Transfer of iodine from soil to vegetables by applying exogenous iodine. *Agronomy for Sustainable Development* 28, 575–583.
- Hsu, C.L., Chen, W., Weng, Y.M., Tseng, C.Y.**, 2003. Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. *Food Chemistry* 83, 85–92.
- Huang, P.C.**, 1980. Effects of high-dietary fiber foods on blood and liver cholesterol

- and other lipids. Scientific Research Abstracts in Republic of China 1, 98–9.
- Johnson, G., Schaal, L.A.**, 1957. Accumulation of phenolic substances and ascorbic acid in potato tuber tissue upon injury and their possible role in disease resistance. American Journal of Potato Research 34, 200–209.
- Johnson, A.A.T., Kyriacou, B., Callahan, D.L., Carruthers, L., Stangoulis, J., Lombi, E., Tester, M.**, 2011. Constitutive overexpression of the *OsNAS* gene family reveals single-gene strategies for effective Iron- and Zinc-Biofortification of rice endosperm. PLoS ONE 6(9): e24476. doi:10.1371/journal.pone.0024476.
- Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B., Kanner, J.**, 1993. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. Food technology 47, 85–89.
- Kim, D.O., Jeong, S.W., Lee, C.Y.**, 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. Food Chemistry 81, 321–326.
- Lange, H., Shropshire, W., Mohr, H.**, 1971. An analysis of phytochrome-mediated anthocyanin synthesis. Plant Physiology 47, 649–655.
- Law, M.Y., Charles, S.A., Halliwell, B.**, 1983. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of Paraquat. Biochemical Journal 210, 899–903.
- Lawson, P.G., Daum, D., Czauderna, R., Meuser, H., Härtling, J.W.**, 2015. Soil versus foliar iodine fertilization as a biofortification strategy for field-grown vegetables. Frontiers in Plant Science. doi: 10.3389/fpls.2015.00450.
- Li, Z., Zhao, X., Sandhu, A.K., Gu, L.**, 2010. Effects of exogenous abscisic acid on yield, antioxidant capacities, and phytochemical contents of greenhouse grown lettuces. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 6503–6509.
- Liu, R.H.**, 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. Journal of Nutrition 134, 3479S–3485S.
- Mao, H., Wang, J., Wang, Z., Zan, Y., Lyons, G., Zou, C.**, 2014. Using agronomic biofortification to boost zinc, selenium, and iodine concentrations of food crops grown on the loess plateau in China. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 14, 459–470.
- Müller, F.**, 2013. Can biofortified plants accumulate trace elements essential to the growth and development of humans?. Ph.D thesis, University of the Western Cape.
- Nicolle, C., Cardinault, N., Gueux, E., Jaffrelo, L., Rock, E., Mazur, A., Amouroux, P., Rémésy, C.** (2004): Health effect of vegetable-based diet: lettuce consumption improves cholesterol metabolism and antioxidant status in the rat. Clinical Nutrition 23, 605–614.
- Nie, X., Zhao, Z.P., Chen, G.P., Zhang, B., Ye, M., Hu, Z.L.**, 2013. *Brassica napus* possesses enhanced antioxidant capacity via heterologous expression of anthocyanin pathway gene transcription factors. Russian Journal of Plant Physiology 60, 108–115.
- Oh, S.H., Moon, Y.J., Oh, C.H.**, 2003. γ -Aminobutyric Acid (GABA) content of selected uncooked foods. Nutraceuticals and Food 8, 75–78.
- Okamura, M.**, 1980. An improved method for determination of L-ascorbic acid and L-dehydroascorbic acid in blood plasma. Clinica Chimica Acta 103, 259–268.
- Park, S., Valan Arasu, M., Lee, M.K., Chun, J.H., Seo, J.M., Lee, S.W., Al-Dhabi, N.A., Kim, S.J.**, 2014. Quantification of glucosinolates, anthocyanins, free amino acids, and vitamin C in inbred lines of cabbage (*Brassica oleracea* L.). Food Chemistry 145, 77–85.
- Pérez-López, U., Miranda-Apodaca, J., Muñoz-Rueda, A., Mena-Petite, A.**, 2013.

- Lettuce production and antioxidant capacity are differentially modified by salt stress and light intensity under ambient and elevated CO₂. *Journal of Plant Physiology* 170, 1517–1525.
- Podsędek, A.**, 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology* 40, 1–11.
- Ramesh, S.A., Choimes, S., Schachtman, D.P.**, 2004. Over-expression of an *Arabidopsis* zinc transporter in *Hordeum vulgare* increases short-term zinc uptake after zinc deprivation and seed zinc content. *Plant Molecular Biology* 54, 373–385.
- Rengel, Z., Graham, R.D.**, 1995. Wheat genotypes differ in Zn efficiency when grown in chelate-buffered nutrient solution. *Plant and Soil* 176, 307–316.
- Rivero, R.M., Ruiz, J.M., García, P.C., López-Lefebvre, L.R., Sánchez, E., Romero, L.**, 2001. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science* 160, 315–321.
- Sagardoy, R., Morales, F., López-Millán, A.F., Abadía, A., Abadía, J.**, 2009. Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biology* 11, 339–350.
- Salunkhe, D.K., Kadam, S.S.**, 1998. *Handbook of Vegetable Science and Technology: Production, Storage and Processing*, 1st edition. Marcel Dekker, Inc. Madison Avenue, New York, USA.
- Sayre, R., Beeching, J.R., Cahoon, E.B., Eges, C., Fauquet, C., Fellman, J., Fregene, M., Gruissem, W., Mallowa, S., Manary, M., Maziya-Dixon, B., Mbanaso, A., Schachtman, D.P., Siritunga, D., Taylor, N., Vanderschuren, H., Zhang, P.**, 2011. The BioCassava Plus Program: biofortification of Cassava or Sub-Saharan Africa. *Annual Review of Plant Biology* 62, 251–272.
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., Bitsch, R.**, 2002. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research* 36, 177–187.
- Serafini, M., Bugianesi, R., Salucci, M., Azzini, E., Raguzzini, A., Maiani, G.**, 2002. Effect of acute ingestion of fresh and stored lettuce (*Lactuca sativa*) on plasma total antioxidant capacity and antioxidant levels in human subjects. *British Journal of Nutrition* 88, 615–623.
- Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D.**, 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32, 67–103.
- Sharma, N.K., Dey, S., Prasad, R.**, 2008. Antioxidant potential in plants and their impact on human health. In Kumar A., Sopory S.K (Eds). *Recent Advances in Plant Biotechnology and Its Applications*. New Delhi: I.K. International Publication. pp 564–581.
- Shelp, B.J., Bown, A.W., McLean, M.D.**, 1999. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Science* 4, 446–452.
- Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M.**, 1981. Utilization index: A modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. *Journal of Plant Nutrition* 4, 289–302.
- Singh, J., Upadhyay, A.K., Bahadur, A., Singh, B., Singh, K.P., Rai, M.**, 2006. Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata). *Scientia Horticulturae* 108, 233–237.
- Sorgonà, A., Abenavoli, M.R., Gringeri, P.G., Cacco, G., 2006. A comparison of nitrogen use efficiency definitions in Citrus rootstocks. *Scientia Horticulturae* 109, 389–393.

- Thavarajah, D., Thavarajah, P.**, 2012. Evaluation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) micronutrient composition: Biofortification opportunities to combat global micronutrient malnutrition. *Food Research International* 49, 99–104.
- Vasconcelos, M., Datta, K., Oliva, N., Khalekuzzaman, M., Torrizo, L., Krishnan, S., Oliveira, M., Goto, F., Datta, S.K.**, 2003. Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene. *Plant Science* 164, 371–378.
- Wang, H., Cao, G., Prior, R.L.**, 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 701–705.
- Waters, B.M., Sankaran, R.P.**, 2011. Moving micronutrients from the soil to the seeds: Genes and physiological processes from a biofortification perspective. *Plant Science* 180, 562–574.
- Welch, R.M., Graham, R.D.**, 2004. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany* 55, 353–364.
- Wellburn, A.R.**, 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144, 307–313.
- Weng, H., Hong, C., Xia, T., Bao, L., Liu, H., Li, D.**, 2013. Iodine biofortification of vegetable plants—An innovative method for iodine supplementation. *Chinese Science Bulletin* 58, 2066–2072.
- White, P.J., Broadley, M.R.**, 2005. Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends in Plant Science* 10, 586–593.
- White, P.J., Broadley, M.R.**, 2009. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist* 182, 49–84.
- White, P.J., Broadley, M.R.**, 2011. Physiological limits to zinc biofortification of edible crops. *Frontiers in Plant Science* 2, 1–11.
- Wolf, B.**, 1982. A comprehensive system of leaf analyses and its use for diagnosing crop nutrient status. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 13, 1035–1059.
- Yadav, S.K., Singla-Pareek, S.L., Reddy, M.K., Sopory, S.K.**, 2005. Transgenic tobacco plants overexpressing glyoxalase enzymes resist an increase in methylglyoxal and maintain higher reduced glutathione levels under salinity stress. *FEBS Letters* 579, 6265–6271.
- Zhang, G., Bown, A.W.**, 1997. The rapid determination of γ -aminobutyric acid. *Phytochemistry* 44, 1007–1009.

Biofortificación con Carbonato de Calcio en pimiento morrón y su efecto en la calidad y capacidad antioxidante

2

Flores Córdova, María Antonia; Soto Parra, Juan Manuel; Sánchez Chávez, Esteban; Salas Salazar, Nora Aidé; Soto Caballero, Mayra Cristina; Pérez Leal, Ramona.

2.1 Resumen	23
2.2 Introducción	23
2.3 Materiales y Métodos	24
2.4 Resultados y Discusión	25
2.5 Conclusiones	30
2.6 Bibliografía	31

2

Biofortificación con Carbonato de Calcio en pimiento morrón y su efecto en la calidad y capacidad antioxidante

Flores Córdova, María Antonia; Soto Parra, Juan Manuel; Sánchez Chávez, Esteban; Salas Salazar, Nora Aidé; Soto Caballero, Mayra Cristina; Pérez Leal, Ramona.

2.1 RESUMEN

La biofortificación es definida como el proceso de incrementar la concentración de elementos esenciales en el producto comestible. El calcio es un elemento que previene desórdenes fisiológicos e influye en la calidad del fruto. El pimiento morrón es uno de los cultivos más importantes y más extensamente producidos en el mundo. Por lo que el objetivo del presente estudio fue biofortificar con carbonato de calcio (CaCO_3), mediante aplicaciones al suelo y foliar, bajo condiciones de invernadero, con el propósito de analizar su efecto en la calidad y capacidad antioxidante del fruto de pimiento morrón. Se realizó un análisis factorial 5^2 con 13 tratamientos con 5 repeticiones y cada repetición de dos bolsas con tres plantas cada uno. Los niveles de aplicación se fraccionaron en dos aplicaciones separadas y espaciadas por 30 días. Los resultados obtenidos indicaron que la biofortificación con carbonato de calcio, incrementaron sustancialmente la capacidad antioxidante, firmeza, tamaño y peso del fruto. Finalmente se concluye que la biofortificación con carbonato de calcio, favoreció la calidad del pimiento morrón y capacidad antioxidante, resultando la biofortificación una técnica que se puede aprovechar como práctica agronómica.

Palabras clave: *Capsicum annum*; Firmeza; CaCO_3 ; Capacidad antioxidante

2.2 INTRODUCCIÓN

La biofortificación es definida como el proceso de incrementar la concentración de elementos esenciales en el producto comestible (Ruiz, 2013). Se considera que un alimento está biofortificado o enriquecido cuando la proporción de uno o varios de los nutrientes que lo integran es superior a su composición normal, la cual se ha modificado o producido de forma artificial. Añadir nutrientes a los alimentos es una práctica que se originó a

principios del siglo XIX, cuando el químico francés Boussingault recomendó agregar yodina a la sal de mesa para prevenir el bocio en Sudamérica (Tébar 2007). En el Reino Unido, la harina se ha enriquecido con calcio desde la Segunda Guerra Mundial, cuando se anticipó un suministro reducido de productos lácteos. Por lo que la biofortificación de diversos cultivos alimenticios con Ca se ha sugerido como un buen método estratégico para mejorar la calidad nutricional del cultivo, la cual es viable y segura e incluso más económica y conveniente en la ingesta humana y ambientalmente ventajosa (Dayot et al., 2010).

El pimiento morrón (*Capsicum annum*), es un alimento muy importante a nivel mundial por su alto contenido de vitaminas A, C, minerales, fibra dietética, hidratos de carbono y compuestos antioxidantes como los carotenoides (Paradikovic et al., 2011). Según la FAO, se estima que en el año 2010 se cultivaron 537,815 ha de pimiento en todo el mundo. La horticultura pretende incrementar el rendimiento y la productividad para proveer de vegetales a una población en crecimiento. En la actualidad, la calidad es aún más importante que el rendimiento debido al rol benéfico que tienen los vegetales en la dieta humana. El calcio, tiene un sin número de funciones metabólicas, tanto en planta como en pos cosecha, en donde un aporte equilibrado y oportuno de las fuentes de calcio durante el crecimiento y en etapa de pos cosecha, podrían mejorar la vida útil y calidad nutricional del fruto (Ahgdam et al., 2012).

Además, la sociedad actualmente demanda productos con una alta calidad nutricional, capaces de satisfacer las necesidades nutricionales tras su consumo (Ruiz, 2013). Sin embargo, la ingesta dietética humana de Ca, en la mayoría de los casos, se encuentra por debajo de la ingesta diaria recomendada (IDR) de 800-

1,300 mg, y se cree que esto resulta en altos costos de salud (Vatanparast et al., 2010).

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado una relación directa entre una dieta rica en frutas y hortalizas y la menor incidencia de enfermedades crónicas. Efecto que se atribuye a la presencia de minerales, vitaminas, compuestos bioactivos y fibra. Los cuales ejercen un efecto protector ante algunas enfermedades degenerativas. Estas sustancias en su mayoría se caracterizan por su capacidad antioxidante y son una alternativa natural que protege de la oxidación a las macromoléculas biológicas en el cuerpo (Cano et al., 2005). Estos compuestos cumplen un papel crítico como protectores de procesos celulares ante el estrés oxidativo, que genera un desbalance entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes (Rousseaux et al., 2005).

Por lo tanto, esto puede satisfacerse mediante, la suplementación con minerales, la fortificación de los alimentos o el aumento de la concentración y/o la biodisponibilidad de los elementos minerales y compuestos bioactivos en los productos (White y Broadley. 2008).

La investigación actual provee la posibilidad de ser capaces de mejorar la calidad del fruto basados en el desarrollo de nuevas tecnologías. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es determinar la calidad y capacidad antioxidante del pimiento morrón mediante la aplicación

carbonato de calcio en el sustrato y aspersión foliar, bajo condiciones de invernadero.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Ubicación del experimento

El trabajo se realizó en un invernadero comercial ubicado en el Seccional de Álvaro Obregón, Municipio de Cuauhtémoc, durante el ciclo productivo 2016. El área del invernadero es de 300 m², equipado con extractores, calefacción central a base de leña, sistema de riego de goteo, medianamente automatizado.

Se utilizaron plantas de pimiento morrón variedad Canon, se plantaron en bolsas de sustrato tipo bolis con 3 plantas por cada bolsa de 100 cm de largo X 15 cm de alto X 20 cm ancho, con peso aproximado de 3 kg capacidad.

2.3.2 Diseño experimental

El arreglo experimental fue de Cinco de Oros, experimento factorial 5² abreviado a 13 tratamientos para evaluar superficie de respuesta lineal, cuadrática e interacción de factores para generar 13 tratamientos (**Cuadro 1**), cada uno con 5 repeticiones y cada repetición de dos bolsas (bolis) con tres plantas cada uno. Los niveles de aplicación por cada tipo (suelo y foliar) se fraccionaron en dos aplicaciones separadas y espaciadas por 30 días.

Cuadro 1 • Factores y niveles para las aplicaciones foliares y al suelo en pimiento morrón

Factores	Niveles				
	0	1	2	4	8
Pimiento Morrón					
Carbonato de Calcio kg (CaO) ha ⁻¹ (Suelo)	0.0	800	1600	3200	6400
Carbonato de Calcio (Ca) kg ha ⁻¹ (Foliar)	0.0	115	30	60	120

2.3.3 Material Vegetal

Se recolectaron 12 frutos por tratamiento, los cuales se trasladaron al laboratorio de

bioquímica y fisiología de la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, en donde se evaluaron las variables de peso y diámetro así como firmeza, una vez terminado el proceso se

lavar los frutos para su desinfección y se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente se determinaron la concentración de compuestos fenólicos, así como la capacidad antioxidante del fruto.

2.3.4 Parámetros de calidad evaluados

2.3.4.1 Peso del fruto

El peso del fruto fue tomado con una báscula digital Scout Pro y fue expresado en gramos.

2.3.4.2 Diámetro del fruto

Para esta determinación se utilizaron 9 frutos por repetición, usando vernier en mm.

2.3.4.3 Firmeza

La firmeza de la pulpa del fruto se determinara con un penetrómetro (Brookfield modelo CT3 Texture Analyzer) con puntal número 7, en donde se tomaron lecturas de dos lados de la cara. Los datos obtenidos se expresaran en Newtons (N).

2.3.5 Capacidad antioxidante

El análisis se realizó de acuerdo a la metodología de Meir *et al.* (1995). El extracto se obtuvo macerando 5 g del fruto en 5 mL de metanol al 80 %, posteriormente se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Del sobrenadante resultante se tomaron 0,5 mL del extracto y se mezclaron con 2,5 mL de una solución 0,1 mM de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) recién preparada, y la mezcla se incubó durante 60 min. en obscuridad. La absorbancia será midió por espectrofotometría a A_{517} . Para la muestra blanco se reemplazó el extracto por 0,5 mL de metanol.

2.3.6 Análisis estadístico

Se utilizó un experimento factorial 5^5 abreviado, mediante el esquema 5 de oros que nos arroja 13

tratamientos para estimar superficie de respuesta lineal y cuadrática. Para lo cual, se utilizó el paquete estadístico SAS (2002). SAS/STAT users guide: Statics, Ver. 9.00. En caso de detectarse respuesta estadística para las regresiones lineal y cuadrática se graficó de manera individual para cada factor, en tanto que cuando hubo interacción entre factores se grafican de manera conjunta en tercera dimensión.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Determinación de peso y diámetro polar

En el Cuadro 2, se presenta la superficie de respuesta máxima para peso y diámetro polar en pimiento morrón, biofortificados con carbonato de calcio al suelo y foliar (factores), en el cual se obtuvo una media general de 197.1 en peso y una R^2 0.082, y la media general para diámetro ecuatorial fue de 82.5 y un coeficiente de determinación R^2 0.0782 en pimiento morrón. No se presentaron diferencias significativas en los tratamientos, sin embargo, observamos que tanto en peso como en Diámetro polar, la influencia se ve reflejada en la aplicación al sustrato, en donde a mayor incremento de peso, mayor cantidad de kg ha^{-1} de carbonato de calcio fue requerida.

Autores como Alvares *et al.*, 2016, obtuvieron un promedio de 115.49 a 142.96 g de peso fresco en frutos de pimiento, con la aplicación de CaNO_3 al sustrato y en este trabajo los promedios estuvieron de 190.3 a 204.0 un poco más elevados, por lo que la aplicación de carbonato de calcio, favoreció el incremento del peso y diámetro polar.

Cuadro 2 • Superficie de respuesta máxima^X para rendimiento en pimiento morrón bajo condiciones de invernadero tratados con carbonato de calcio en aplicación suelo y foliar

Peso				Diámetro Polar			
Regresión		Factores		Regresión		Factores	
		CaCO ₃ Suelo	CaCO ₃ Foliar			CaCO ₃ Suelo	CaCO ₃ Foliar
Linear (L)	0.1410 ^W	0.5081 ^Y	0.4358	Linear (L)	0.1937	0.4426	0.4931
Cuad. (C)	0.5601			Cuad. (C)	0.5489		
Productos	0.8015			Productos	0.5205		
Modelo	0.3393	R ² 0.0822	μ 197.1	Modelo	0.4251	R ² 0.0782	C.V. 8.67 μ 82.5
		C.V. 13.21					
Peso g	E.E. ^Z	Kg ha ⁻¹	L ha ⁻¹	Diámetro polar mm	E.E. ^Z	Kg ha ⁻¹	L ha ⁻¹
190.3	7.048	3200.0	60.0	80.6	1.937	3200.0	60.0
191.2	6.978	3411.0	55.5	80.8	1.916	3397.4	55.3
192.3	6.845	3619.2	50.9	81.1	1.878	3599.8	50.6
193.4	6.657	3824.2	46.3	81.5	1.827	3806.2	46.0
194.6	6.427	4025.7	41.7	81.8	1.765	4015.8	41.5
196.0	6.178	4223.4	36.9	82.2	1.699	4228.1	37.0
197.4	5.943	4416.8	32.2	82.7	1.636	4442.6	32.6
198.9	5.771	4605.5	27.3	83.2	1.587	4659.0	28.1
200.5	5.724	4788.9	22.4	83.7	1.570	4876.8	23.7
202.2	5.875	4966.5	17.4	84.3	1.596	5096.0	19.4
204.0	6.283	5137.6	12.2	84.9	1.680	5316.4	15.0
Incrementos (+) decrementos (-) con respecto a la media simple							
+7.2		+60.5	-79.6	+5.3		+66.1	-75.0
Análisis canónico de la superficie de respuesta							
Predicho punto fijo	Valores críticos		Predicho punto fijo	Valores críticos			
185.89 ^V	1037.40	102.08	79.94	2266.20	90.51		
Eigenvalores ^{U1}	Eigenvectores		Eigenvalores ^{U1}	Eigenvectores			
5.9802	0.6163	0.7875	1.9998	0.7221	-0.6917		
4.5988	0.7875	-0.6163	1.0554	0.6917	0.7221		

^XAnálisis de cordillera (Ridge); μ Media general, C.V. Coeficiente de variación, R² Coeficiente de determinación. ^Wprobabilidad de F: Pr \geq 0.05 No significativo, Significativo 0.05 \leq Pr \leq 0.01, altamente significativo Pr \leq 0.01 ^YRespuesta (Pr > |t|) significativa lineal (L), cuadrática (C), productos significativos de ese nutriente con el resto; ^ZError estándar, ^{U1}Punto estacionario es un mínimo, ^Vdatos decodificados.

2.4.2 Determinación de diámetro ecuatorial

En el **Cuadro 3**, se observan diferencias significativas en la biofortificación al sustrato y foliar, presentando una media de 80.1 y un R² de 0.2244, la superficie lineal y cuadrática también fueron significativas, lo cual nos indica que tanto la aplicación al sustrato como la biofortificación foliar influyó en el diámetro ecuatorial, en donde a partir de la media podemos observar que presentaron un incremento del diámetro, a mayor concentración de carbonato de calcio, en comparación con el testigo En donde la biofortificación al sustrato se vio influenciada en una interacción con la aplicación foliar, por lo que podemos decir que

la biofortificación con carbonato de calcio influyó en el incremento del diámetro ecuatorial.

En la **Figura 1** se observa el resultado para diámetro ecuatorial, en donde se presenta el comportamiento del diámetro a través de los factores de la biofortificación con carbonato de calcio aplicado al suelo, el cual presentó el mayor efecto en la concentración de 3800 kg de Ca CO₃ ya que a partir de aquí se presentó un incremento de diámetro ecuatorial, no obstante, dado el efecto cuadrático de los niveles de concentración, se presentó un nivel mínimo. Lo que indica que la biofortificación con carbonato de calcio tuvo influencia en el incremento del tallo, favoreciendo el desarrollo de la planta.

Cuadro 3 • Superficie de respuesta máxima^X para diámetro ecuatorial en pimiento morrón bajo condiciones de invernadero biofortificado con carbonato de calcio en aplicación suelo y foliar

Diámetro ecuatorial			
Regresión		Factores	
		CaCO ₃ Suelo	CaCO ₃ Foliar
		0.0972 ^W	0.0240
Linear (L)	0.0063 ^W	C ^Y	L
Cuad. (C)	0.0722		
Productos	0.4763		
Modelo	0.0089	R ² 0.2244 C.V. 4.47	μ 80.1
Diámetro ecuatorial mm	E.E. ^Z	Kg ha ⁻¹	L ha ⁻¹
78.1	0.970	3200.0	60.0
78.3	0.958	3374.7	55.0
78.5	0.937	3561.6	50.1
78.8	0.911	3763.8	45.4
79.1	0.881	3984.5	41.0
79.4	0.851	4227.6	37.0
79.7	0.823	4496.8	33.5
80.1	0.803	4974.2	30.5
80.5	0.800	5119.1	28.2
80.9	0.826	5467.5	26.7
81.4	0.8963	5832.3	25.9
Incrementos (+) decrementos (-) con respecto a la media simple			
+4.2		+82.3	-56.9
Análisis canónico de la superficie de respuesta			
Predicho punto fijo	Valores críticos		
77.14 ^V	1905.33	108.99	
Eigenvalores ^{U1}	Eigenvectores		
1.9647	0.9461	0.3239	
1.1097	-0.3239	0.9461	

^XAnálisis de cordillera (Ridge); μ Media general, C.V. Coeficiente de variación, R² Coeficiente de determinación. ^Wprobabilidad de F: Pr ≥ 0.05 No significativo, Significativo 0.05 ≤ Pr ≤ 0.01, altamente significativo Pr ≤ 0.01 ^YRespuesta (Pr > |t|) significativa lineal (L), cuadrática (C), productos significativos de ese nutriente con el resto; ^ZError estándar, ^{U1}Punto estacionario es un mínimo, ^{U2}punto estacionario es un punto silla ^Vdatos decodificados.

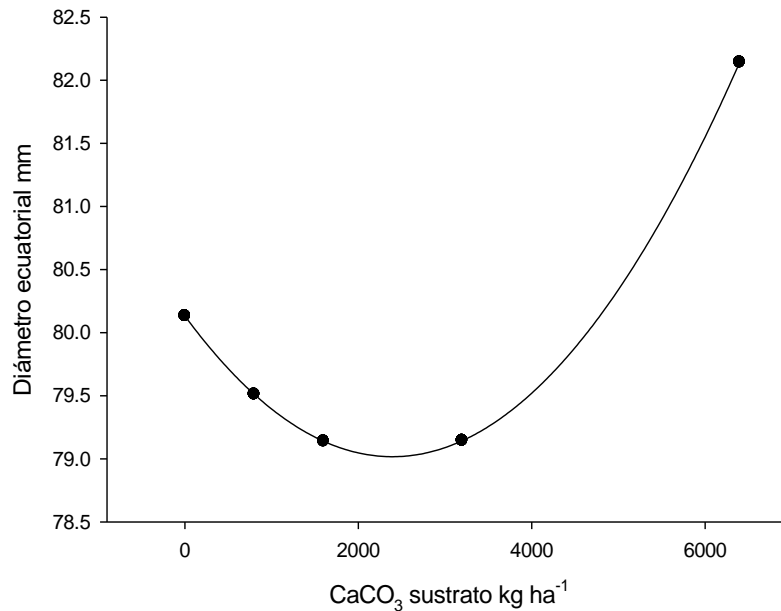


Figura 1 • Resultados del diámetro ecuatorial biofortificado con carbonato de calcio en aplicaciones al sustrato.

En la **Figura 2** se observa el resultado para el diámetro polar en donde se presenta el comportamiento del diámetro a través de los factores de biofortificación con carbonato de calcio foliar siendo la aplicación foliar, en donde se presenta un nivel mínimo el cual indica que a una aplicación alta el diámetro deja de crecer, y a los 60 kg de carbonato de calcio, llega a su mínimo, para incrementarse a los 100 kg, presentando un ligero incremento.

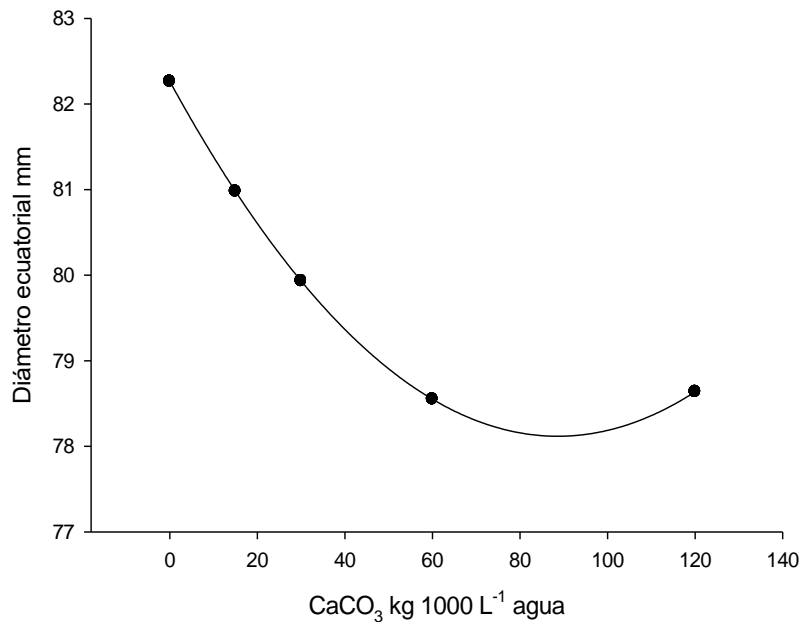


Figura 2 • Resultados del diámetro polar en la biofortificación con carbonato de calcio foliar.

2.4.3 Firmeza

El pimiento morrón presentó diferencias significativas, con una media en firmeza de 29.0 y un coeficiente de determinación R^2 0.2094 y coeficiente de variación de 15.77. Los factores son aplicaciones de CaCO_3 al suelo y foliar, con diferentes niveles. En este caso uno es dependiente del otro, en la aplicación al suelo hay interacción con la aplicación foliar, el cual permite obtener una mayor firmeza. La relación también es evidente con lo reportado por Marschner (2002) quien ha mencionado que con altas dosis de Ca^{2+} las cantidades de este elemento que no logran entrar al citosol quedan en la pared celular, situación que genera pared celular más pesadas y gruesas.

La deshidratación ó pérdida de agua de los frutos de pimiento morrón en pos cosecha

constituyen el principal problema que demerita la calidad de consumo. Autores como Báez-Sañudo et al., (2005) reportan que cuando los frutos pierden del 6 al 7 % de su peso, la firmeza y la apariencia disminuyen y por consecuencia la calidad y vida de anaquel.

En la **Figura 3** se observa el resultado para firmeza en donde se presenta el comportamiento de los factores de la biofortificación con carbonato de calcio foliar y al suelo, en el cual se presenta una interacción entre factores, en este aspecto tanto la aplicación al suelo, como al sustrato el que presentaron efecto en la firmeza, lo cual indica que ambos interaccionan para incrementar este factor, se presentó un nivel máximo.

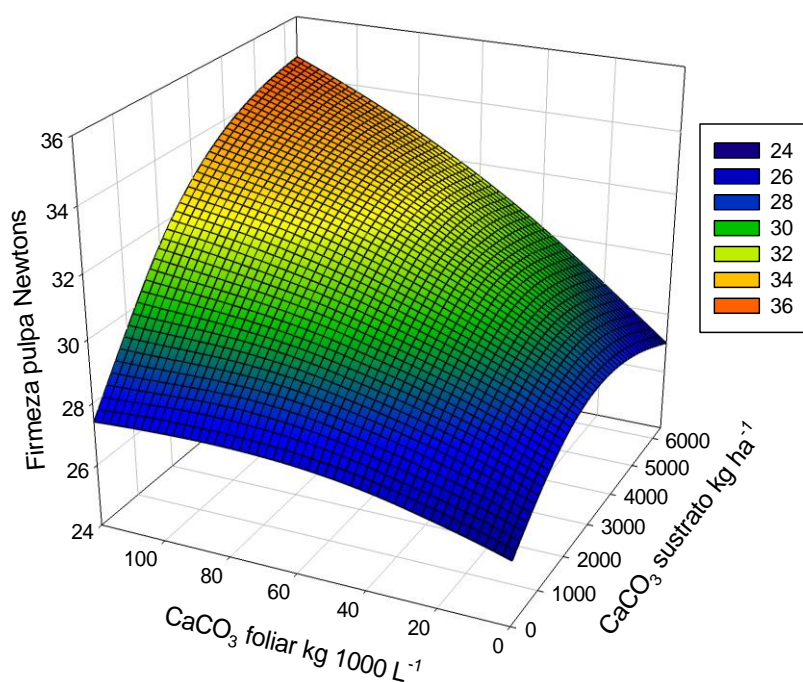


Figura 3 • Resultados para firmeza (lineal y cuadrática) biofortificado con carbonato de calcio en sustrato y foliar.

2.4.4 Determinación de capacidad antioxidante

En relación a la capacidad antioxidante se presentaron diferencias significativas, presentando una media de 70.2, con un R^2 de 0.3710 y un coeficiente de variabilidad de 13.19, con valores entre 3.2 y 4.3 mg de trolox 100 g⁻¹, con un incremento en aplicación al suelo, sin embargo en la aplicación foliar también presentó un incremento, por lo que ambos tratamientos presentaron un efecto al incrementar el contenido de compuestos con capacidad antioxidante.

Estos resultados son más altos que los presentados por Pellegrini et al., (2003), quienes obtuvieron valores de 7.62 ul eq Trolox 100 g⁻¹,

en la misma especie de pimiento *Capsicum annuum* L.

Por lo que los valores obtenidos en este estudio son bastante favorables, ya que de acuerdo a la clasificación de frutos y vegetales los pimientos verdes se encuentran entre el grupo que contiene de 500 a 1000 $\mu\text{mol eq Trolox } 10\text{g}^{-1}$ Pennington y Fisher (2009).

En la **Figura 4** se observa el resultado para capacidad antioxidante en donde se presenta el comportamiento de los factores de carbonato de calcio al sustrato siendo la aplicación al suelo el que presentó el mayor efecto en la aplicación de 4000 kg ya que a partir de ahí se presenta un incremento de la capacidad, incidiendo en el comportamiento del fruto, hasta llegar a un máximo de 8000 kg.

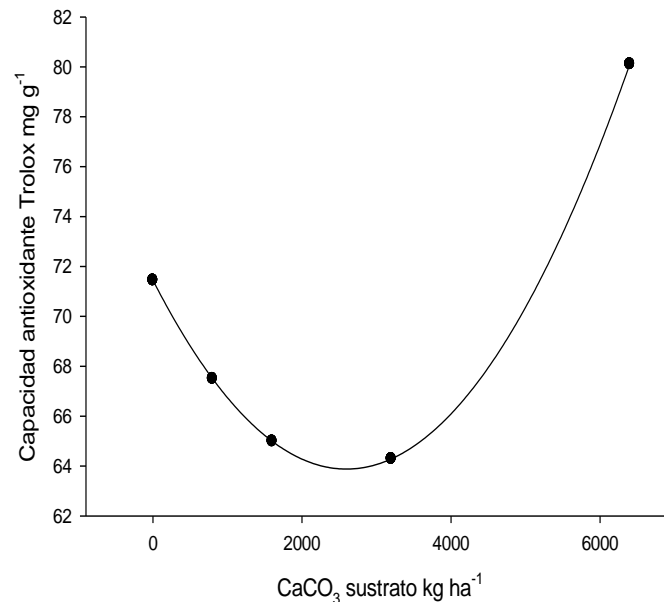


Figura 4 • Resultados para capacidad antioxidante (lineal y cuadrática) biofortificado con carbonato de calcio en sustrato.

Así mismo, las diferencias pueden ser presentadas por las diferentes variedades que se evaluaron, geografía y factores bióticos y abióticos.

2.5 CONCLUSIONES

La biofortificación con carbonato de calcio al sustrato y vía foliar, favoreció la calidad en pimiento morrón, los

parámetros que respondieron a la aplicación foliar fueron, diámetro ecuatorial. Los parámetros que influyeron con el sustrato fueron: peso, diámetro polar diámetro, capacidad antioxidante.

El parámetro que se vio influenciado por la interacción de la aplicación al suelo y foliar fue la variedad de firmeza. Por lo que la biofortificación de carbonato de calcio se vio favorecida en la calidad y capacidad antioxidante del pimiento morrón, el cual puede ser una alternativa agronómica, para favorecer su calidad.

2.6 BIBLIOGRAFÍA

- Aghdam, M.S, Massanpouraghdam, M-B, Paliyath, G, Farmani, B.** 2012. The language of calcium in postharvest life of fruits, vegetables and flowers. *Scientia Horticulturae* (Amsterdam) 144: 102–115.
- Álvarez-Mares, V., Partida-Ruvalcaba, L., Godoy-Vega, F., Medina-Montenegro H. M., Millán Ocampo S., Cárdenas Flores, A., Cárdenas C., H. M.** 2016. Eficacia de formulaciones y dosis de calcio en el rendimiento de pimiento morrón. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7(28): 1689-1699.
- Cano, M.P., C. Sánchez-Moreno, S. de Pascual-Teresa y B. de Ancos.** 2005. Procesado mínimo y valor nutricional. pp.118. *In: G. González-Aguilar* (ed.). Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. CIAD México.
- Davod, M., Donal, S. T., Allen, L. R., Gilliam, M.** 2010. Calcium storage in plants and the implications for calcium biofortification.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).** 2009. Food Composition tabla for vegetables and fruits. www.fao.org/infoods/index_en.htm.
- Marschner, H.** 2002. Mineral nutrition of higher plants. Second Edition, Academic Press London. 889 p.
- Meir, s., kanner, j., akiri, b., hadas, SP.** 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal Agricultural Food Chemistry* 43: 1813-181.
- Paradikovic, N. Vinkovic, T. VinkovicV. I. Zuntar, I. Bojic, M. and Medic-Saric, M.** 2011. Effect of natural biostimulants on yield and nutritional quality: an example of sweet yellow pepper (*Capsicum annum*

- L.) plants. *Journal Science Food Agriculturae*. 91: (12):2146-2152.
- Pellegrini, N., M. Serafini, B. Colombi, D. Del Rio, S. Salvatore, M. Bianchi and F. Brighenti.** 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J. Nutr.* 133(9): 2812-2819.
- Pennington, J.A.T. and R. A. Fisher.** 2009. Classification of fruits and vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22S: S23-S31.
- Ríos Ruiz, J.J.** 2013. Biofortificación: La agricultura del futuro. *Tierras*. No. 203. J26-J28.
- Rousseaux, M.C., C.M. Jones, D. Adams, R. Chetelat, A. Bennett and A. Powell.** 2005. QTL analysis of fruit antioxidants in tomato using *Lycopersicon pennellii* introgression lines. *Theor Appl Genet* 111:1396-1408.
- SAS** (2002). SAS/STAT users guide: Statics, Ver. 9.00. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA. 1503 pp.
- Tébar, E.** 2007. Tomates biofortificados con ácido fólico, ¿una herramienta para combatir enfermedades neurológicas?. <http://audio.urcm.net/Tomates-biofortificados-con-acido>.
- White, J. P. and Broadley, M. R.** 2009. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *Journal compilation. New phytologist*. 182- 49-84.
- Vatanparast H, Bailey DA, Baxter-Jones ADG, Whiting SJ** (2010) Calcium requirements for bone growth in Canadian boys and girls during adolescence. *Brit J Nutr* 103:575–580

Biofortificación con Calcio para mejorar contenido nutricional y conservar calidad de manzana “Top Red”



Soto Parra, Juan Manuel; Sánchez Chávez, Esteban; Porras Flores, Damián Aarón; Yáñez Muñoz, Rosa María; Flores Plascencia, Jairo Baldemar; Noperi Mosqueda, Linda Citlali; Piña Ramírez Francisco Javier; Pérez Leal, Ramona.

3.1 Resumen	35
3.2 Introducción	35
3.3 Materiales y Métodos	36
3.4 Resultados y Discusión	39
3.5 Conclusiones	58
3.6 Bibliografía	59

3

Biofortificación con Calcio para mejorar contenido nutricional y conservar calidad de manzana “Top Red”

Soto Parra Juan Manuel; Sánchez Chávez, Esteban; Porras Flores, Damián Aarón; Yáñez Muñoz Rosa María; Flores Plascencia, Jairo Baldemar; Noperi Mosqueda, Citlali; Piña Ramírez Francisco Javier; Pérez Leal, Ramona.

3.1 RESUMEN

El estado de Chihuahua cuenta con 28 mil hectáreas de manzano que generaron 585 mil 877 toneladas con una derrama de 5 mil 545 millones de pesos. Una vez obtenida la cosecha, la mayor parte tendrá que almacenarse por lo que el fruto debe reunir atributos de calidad en que el calcio se ha constituido como nutriente específico, hasta ahora se ha manejado con aspersiones foliares, sin embargo, los resultados son cada vez más desalentadores. A pesar de su importancia para la salud humana, la insuficiencia en la ingesta de calcio en la dieta es un problema mundial, por lo que es necesaria la biofortificación de productos hortofrutícolas y cereales para asegurar una mayor ingesta. El objetivo fue comprobar si el carbonato de calcio aplicado al suelo y en aspersión foliar representa una alternativa mejorar calidad y biofortificar con calcio el fruto de manzana. El trabajo se realizó en 2017 en árboles de manzano ‘Top Red’ / MM111, el esquema experimental consistió en un arreglo factorial abreviado con dos factores cada uno a cinco niveles, carbonato de calcio aplicado al suelo aplicado el 12 de julio a 0.0, 50, 250.0, 500.0 y 750.0 kg por hectárea, carbonato de calcio vía aspersión foliar a 0, 2.0, 10.0, 20.0 y 30.0 kg por 1000 litros de agua con cuatro aplicaciones a partir de aquella fecha, el análisis estadístico fue por superficie de respuesta. La cosecha se realizó el 28 de agosto (151 DDCF), se evaluó tamaño, color, firmeza, sólidos solubles totales, acidez titulable y relación azúcar acidez en cosecha y postcosecha; se determinó contenido nutricional en hojas y de pulpa del fruto. Se mejoró calidad de manzana en cosecha y su conservación en postcosecha con una dosis de 400 kg ha⁻¹ de carbonato de calcio al suelo y 10 kg 1000 L⁻¹ en aspersión foliar, en contenido nutricional foliar se incrementaron macro y micronutrientes lo que constituyó preámbulo para biofortificación en fruto con fósforo, potasio, calcio, hierro y zinc.

Palabras clave: carbonato de calcio, cosecha y postcosecha, contenido nutricional foliar y fruto, superficie de respuesta.

3.2 INTRODUCCIÓN

El manzano (*Malus domestica* Borkh.) se cultiva en México en una superficie de 57 mil 530 hectáreas que produjeron 714 mil 150 toneladas en 2017 con un valor de 6 mil 230 millones 811 millones de pesos; Chihuahua con 28 mil hectáreas plantadas -49% del total aportó 585 mil 877 toneladas que significaron 5 mil 545 millones de pesos, el 89 del valor de la producción nacional, lo que lo ubica como el principal estado en superficie y producción (SIAP-SIACON, 2018).

Una vez obtenida la cosecha, la mayoría de ella tendrá que almacenarse como una medida de regulación de los mercados por lo que el fruto debe reunir atributos de calidad para refrigeración y posteriormente tener una razonable vida de anaquel tal que llegue al consumidor en condiciones tales como si fuera recién cosechada, en ese tiempo, pueden presentarse situaciones que provoquen pérdidas desde incipientes hasta de un 20% en la calidad de la manzana, entre las que se encuentran disminución abrupta de la firmeza, alta relación azúcar acidez que ocasiona ausencia del sabor característico de la variedad y sensación de harinosidad, desórdenes fisiológicos de colapso senescente, corazón de agua y mancha amarga entre otros que se han recrudecido en presencia, tiempo e intensidad; de ser problemas durante almacenamiento, ahora se observan previo y durante cosecha, todos ellos asociados con una carencia de calcio. Hasta ahora se han tratado de corregir con aspersiones foliares, ya que las aplicaciones de calcio al suelo se considera son ineficientes puesto que el elemento es difícilmente absorbido, es poco móvil dentro de la planta y escasamente llega al fruto; sin embargo, las aspersiones foliares de calcio son

cada vez más desalentadoras aun cuando es requisito de los compradores de cuando menos 8 aplicaciones, ante ello, es tiempo de evaluar aplicaciones de calcio al suelo conjuntamente con aspersiones foliares, el carbonato de calcio puede ser una opción viable en términos de concentración de calcio y costo.

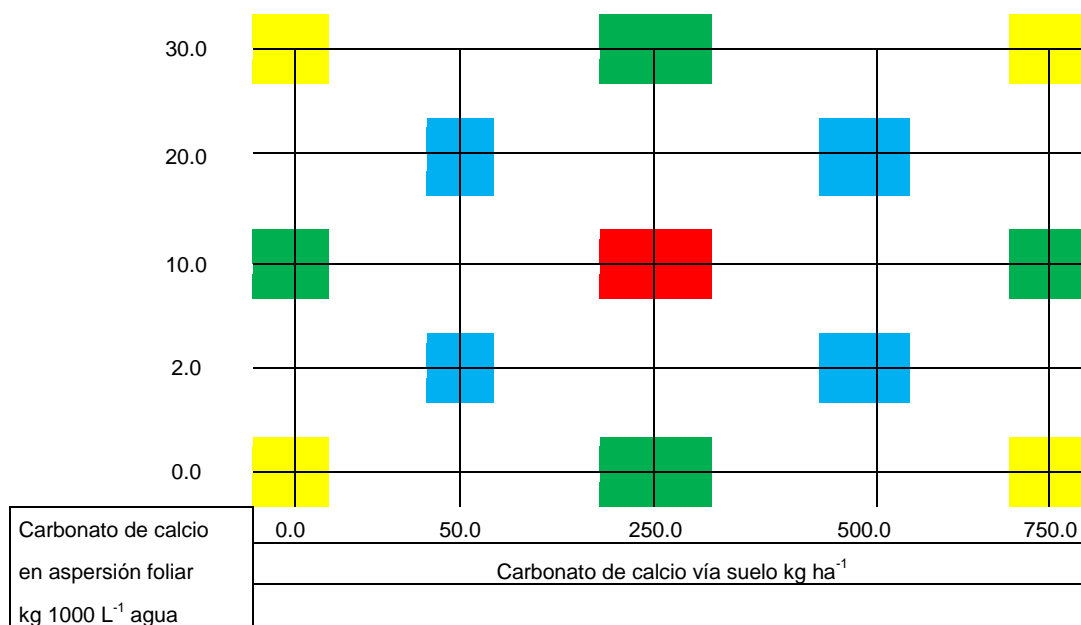
El calcio es un mineral esencial que tiene un papel importante en la coagulación de la sangre, en la activación de muchas enzimas y en las funciones neuromusculares, además de proporcionar rigidez esquelética (Navruz-Varli *et al.*, 2018). A pesar de su importancia para la salud humana, la insuficiencia en la ingesta de Ca en la dieta humana es un problema mundial. La Fundación Nacional de Osteoporosis (NOF) recomienda una ingesta diaria mínima de 1000 mg de calcio para mujeres y hombres de 50 años o más, aumentando a 1200 mg para hombres mayores de 70 años, además de la ingesta de 800-1000 UI de vitamina D y actividad física moderada o vigorosa dependiendo de las capacidades (Roblin *et al.*, 2018). Las principales fuentes de Ca en la dieta son productos lácteos, los cuales aportan hasta 2/3 de la ingesta de Ca de la población, existen productos lácteos enriquecidos con Ca y vitamina D, que proporcionan 400 mg de calcio y 200 UI de vitamina D por porción, lo cual resultan opciones muy recomendables para el consumo humano (Vannucci *et al.*, 2017, Hiligsmann *et al.*, 2017). La biofortificación de los productos hortofrutícolas y los cereales es necesaria para asegurar una mayor ingesta de Ca en la dieta Humana (Broadley y White, 2010). El objetivo fue comprobar si el carbonato de calcio aplicado al suelo y en aspersión foliar representa una alternativa para biofortificar con calcio al fruto que a su vez se refleje en una mejor calidad.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó durante el ciclo vegetativo 2017 en Cuauhtémoc, Chih., en árboles de manzano 'Top Red' / MM111 plantados en 1986 con una densidad de 625 árboles por hectárea. Las características del suelo fueron arena 55.6%, limo 21.4%, arcilla 23%, clasificación migajón fuertemente arenoso; pH CaCl_2 0.01 M 7.06, materia orgánica 1.42%, C.E. 0.70 mmhos cm^{-1} , N- NO_3 47.0 kg ha^{-1} , P 61.3 kg ha^{-1} , K 5325ppm, Ca 4812.5 ppm, Mg 300 ppm, Na 50 ppm, Cu 2.2 ppm, Fe 11.8 ppm, Mn 4.2 ppm, Zn 8.7 ppm.

El esquema experimental consistió en un arreglo factorial abreviado denominado Cinco de Oros con dos factores cada uno a cinco niveles con 13 tratamientos, el primer factor consistió en carbonato de calcio aplicado al suelo en una sola ocasión el 12 de julio a dosis de 0.0, 50, 250.0, 500.0 y 750.0 kg por hectárea, el segundo factor fue carbonato de calcio vía aspersión foliar a concentraciones de 0, 2.0, 10.0, 20.0 y 30.0 kg por 1000 litros de agua con en cuatro aplicaciones a partir del 12 de julio y hasta el 16 de agosto, cada tratamiento constó de tres repeticiones. El esquema experimental gráfico consiste de un cuadrado externo (amarillo), un cuadrado intermedio (verde), cuadrado interno (azul) y el elemento de conexión (rojo) lo que nos permite estimar respuestas lineales y cuadráticas crecientes y decrecientes con puntos igual al número de niveles por cada factor.

El análisis del carbonato de calcio indica que contiene en porcentaje SiO_2 7.12, Al_2O_3 1.81, Fe_2O_3 0.71, CaO 49.23, K_2O 0.16, Na_2O 0.24, SO_3 0.23, humedad 0.47, pasando malla 325 (45 micras) 91.47; análisis de distribución de partículas expresado también como porcentaje (ADP) ADP10 (< 2.72 micras), 2.46; ADP50 (< 12.5 micras), 10.58; ADP90 (< 35.76 micras), 37.54.



La cosecha se realizó el 28 de agosto 151 Días después de completa floración, (DDCF). Se evaluaron 9 frutos por árbol (repetición) tanto en cosecha como en postcosecha (7 meses en atmósfera controlada), para calidad los frutos se dejaron previamente 8 días a temperatura ambiente (tanto después de cosecha como una vez terminado el período de almacenamiento) y entonces de determinó madurez.

En la misma fecha de cosecha se colectaron muestras compuestas de hojas para determinar contenido nutricional foliar, una muestra por tratamiento, 20 hojas del crecimiento del año por cada repetición, 60 por tratamiento.

3.3.1 Parámetros de calidad en fruto

3.3.1.1 Producción

De cada árbol se estimó la producción en kilogramos, previamente calibrada con la cosecha de un árbol y de acuerdo con el responsable técnico, ésta se multiplicó por el número de árboles por hectárea y se expresó en toneladas por hectárea (t ha⁻¹).

3.3.1.2 Diámetro y peso de fruto

Se utilizaron 9 frutos por repetición, para la obtención del diámetro se utilizó un vernier AutoTec con lecturas en mm (dos dígitos de precisión); mientras que el peso fue con una balanza digital Ohaus ScoutTM Pro 0 a 500.00 g.

3.3.1.3 Color

Se tomaron dos medidas de color por fruto (lados intermedios en cuanto a color) para lo cual utilizaron la escala desarrolladas para ‘Red Delicious’ por Soto *et al.* (2001) en seis categorías 1) verde; 2) inicio de formación de estrías color rojo; 3) estrías uniformes de color rojo opaco; 4) estrías de color rojo oscuro evidente; 5) estrías menos uniformes, inicio de color rojo oscuro; y 6) rojo oscuro completo, para hacer la escala más objetiva el color se expresó como porcentaje.

3.3.1.4 Firmeza

Se determinó con un penetrómetro (modelo Effe-Gi 327, 0-28 lb in²) se tomaron dos lecturas por cada fruto en los lados en los que se midió el color y se obtuvo el promedio individual, se seleccionaron cinco frutos representativos de los nueve en los que se midió acabado de fruto.

3.3.1.5 Sólidos solubles totales (SST)

Se obtuvo el extracto de dos gajos de cada fruto (aquellos en donde se introdujo el penetrómetro), se usó un refractómetro (Atago 0 – 32 °Brix) previamente calibrado con agua destilada.

3.3.1.6 Acidez titulable

Se titularon 10 mL del extracto de jugo a partir del cual se determinaron los sólidos solubles totales, se le adicionaron 5 gotas de indicador de fenolftaleína (0.5 g de fenolftaleína más 70 mL de alcohol etílico y se aforaron a 100 mL con agua destilada), titulándose con una solución 0,1 N de NaOH (2.15 g de NaOH 97% pureza, aforados a 500 mL) hasta que se obtuvo un color rosa ladrillo-rojo púrpura; el volumen utilizado se transformó como porcentaje de ácido málico mediante la expresión: % de ácido málico = $((0,1 * ml) / 10) * 67 / 10$.

3.3.1.7 Relación azúcar acidez

Se expresa como partes de azúcar por una de ácido (SST/ Acidez titulable).

3.3.2 Contenido nutricional foliar y de fruto

Las muestras foliares fueron lavadas para quitar cualquier impureza que se tuvieran, secándolas a temperatura ambiente y posteriormente se colocaron en la estufa a una temperatura constante de 60° durante 24 horas. Una vez removida la humedad, las muestras se molieron en molino Wiley y se tamizaron por la malla 20. Posteriormente, determinó el contenido de Nitrógeno total Nt (digestión y destilación, Micro Kjeldahl); Nitratos (NO₃, Ácido Fenol-disulfónico y Espectrofotometría UV-Visible); Fósforo (P, mezcla triácida y metavanadato molibdato de amonio, Espectrofotometría UV-Visible); Potasio, Calcio, Magnesio (K, Ca, y Mg, respectivamente, Mezcla digestora y Espectrofotometría de Absorción Atómica); Sodio, Hierro, Manganeseo, Zinc y Cobre (Na,

Fe, Mn, Zn, y Cu, Mezcla Digestora y Espectrofotometría de Absorción Atómica).

Para el contenido nutricional del fruto, una vez determinados los parámetros de calidad, se separó la cáscara de la pulpa, se sacaron gajos de pulpa desde la periferia hasta el límite de la cavidad de las semillas, se pusieron a secar en papel encerado hasta que perdieron el exceso de humedad (tipo orejón de manzana), se terminaron de secar como las muestras foliares y entonces se siguió el procedimiento para las mismas para determinar el contenido nutricional de la pulpa.

3.3.3 Análisis estadístico

El análisis de superficie de respuesta (SAS, 1989; Vargas *et al.*, 1991) contempló: 1) ajuste del modelo y análisis de varianza para estimar los parámetros. La superficie estimada será típicamente curvada, una colina cuyo pico ocurre en el único punto estimado de máxima respuesta, un valle o una superficie en forma de silla (saddle) sin ningún máximo o mínimo; se determina a) si los tipos de efectos son lineales, cuadráticos o de productos cruzados y cuál es la contribución de cada factor en el ajuste estadístico; 2) correlación canónica para investigar la forma de la superficie de respuesta predicha y cuál factor o factores son las respuestas predichas más sensibles y 3) Análisis de cordillera (ridge) para la búsqueda de la óptima respuesta. Los eigenvalores señalan la dirección de la principal orientación de la superficie, los signos y magnitudes de los eigenvectores asociados proporcionan la forma de la superficie en esas direcciones. Eigenvalores positivos indican direcciones de la curvatura hacia arriba y eigenvalores negativos indican direcciones de la curvatura hacia abajo. El eigenvector mayor para el eigenvalor más grande da la dirección de ascenso pronunciado a partir del punto fijo, si es positivo, o descenso pronunciado, si es negativo. Para determinar si

la solución es un máximo o un mínimo, si los eigenvalores son todos negativos la solución es un máximo, si son todos positivos la solución es un mínimo, si tienen signos mezclados la solución es un punto silla (saddle), si contienen ceros la solución es un área aplanada.

En el análisis de superficie de respuesta los eigenvalores se expresaron como porcentaje de la media y los eigenvectores respectivos se ponderaron en cuartos a partir de 0.25, aproximando al cuarto más cercano y se expresan según su signo; así, + incluye desde 0.250 a 0.374, ++ de 0.375 hasta 0.624, +++ desde 0.625 hasta 0.874, ++++ mayor a 0.875, lo mismo fue para eigenvectores negativos, de esta manera se calcula la contribución de cada factor de manera particular para una variable y en general para todas las variables de respuesta; posteriormente se analizan las frecuencias de signos + y - para seleccionar los factores de mayor contribución, se escogen aquellos cuya frecuencia de signos + sea mayor al 25% dentro de cada variable de respuesta y se contabiliza el número de variables de respuesta para ese factor; para la discriminación de las variables, se seleccionan aquellos factores cuya frecuencia sea mayor al 25% del total de signos, de esta manera los criterios para los factores de mayor peso serán tanto de mayor frecuencia de signos como de mayor variable de respuesta seleccionadas, lo que nos arroja en una primera instancia una dosis de aplicación general; de las variables elegidas, se acude al análisis de regresión y en caso de registrar significancia lineal, cuadrática o de productos, se grafica para determinar si hay un efecto concurrente o antagónico entre factores para finalmente obtener una dosis de amplio espectro.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Calidad cosecha y postcosecha

El carbonato de calcio generalmente se ha venido usando como enmienda de suelo generalmente en breña con molienda de baja graduación sin especificar su pureza y finura por lo que el material varía desde polvo mayor a malla 20 hasta agregados de diferente tamaño lo que dificulta su distribución e incorporación al suelo; esto no sucedió con el carbonato de calcio aquí empleado, puesto que es un subproducto del proceso de elaboración de cemento, que resulta en un polvo cálcico que pasa malla 325 de 45 micras en 91.47% lo que facilita su solubilidad y rapidez de incorporación al suelo; de la misma manera, esta solubilidad hace posible su empleo en aspersión foliar no nada más para manzano, sino todos aquellos cultivos que sean almacenados en refrigeración, transportados a grandes distancias y que sean expuestos en anaquel por varios días; sin embargo, deberán realizarse estudios específicos para determinar las cantidades más apropiadas tanto para suelo como en aspersión foliar e inmersión, éstos dos últimos directamente en contacto con el fruto.

En el **Cuadro 1** observamos la superficie de respuesta para peso y diámetro de fruto en cosecha; se presenta simultáneamente el análisis de regresión y la contribución de cada uno de los factores, análisis canónico de la superficie de respuesta, finalmente los valores predichos y las cantidades necesarias de cada factor según sea respuesta mínima o máxima para alcanzar el valor óptimo en concordancia con el rango original de los datos.

Para peso de fruto cuya respuesta fue mínima, su rango fluctuó desde 143.4 hasta 165.4 gramos (15.3% de incremento) y las respectivas necesidades de carbonato de calcio en aplicación

al suelo fluctuaron desde 145.0 hasta 375.0 kg ha⁻¹ (158.6% de incremento), mientras que en aspersión foliar varió desde 26.8 hasta 15.0 kg por 1000 litros de agua (-44.1% de decremento), se observa además que ambos factores tuvieron

una contribución prácticamente significativa en el ajuste de la regresión y se registraron interacción para productos, la respuesta gráfica para cada factor e interacción se muestra en la **Figura 1.**

Cuadro 1 • Superficie de respuesta^X para peso y diámetro en manzanas 'Top Red' tratadas con carbonato de calcio en aplicación al suelo y en aspersión foliar. Cosecha

Peso (mínima) ^X				Diámetro (mínima) ^X			
Factores				Factores			
Suelo				Suelo			
Foliar				Foliar			
Regresión				Regresión			
		0.0762 ^W	0.0480			0.0101	0.0095
Linear (L)	0.7873 ^W			Linear (L)	0.6533	C ^Y	C
Cuad. (C)	0.2267	Foliar ^Y		Cuad. (C)	0.0582	Foliar	
Productos	0.0154			Productos	0.0031		
Modelo	0.1009	R ² 0.2347	μ 150.7	Modelo	0.0129	R ² 0.3430	μ 70.3
		C.V. 16.77				C.V. 6.04	
Análisis canónico de la superficie de respuesta							
Predicho punto fijo		Valores críticos		Predicho punto fijo		Valores críticos	
165.4176		385.5931 14.8815		74.0346		437.6484 15.9054	
Eigenvalores ^{U1}		Eigenvectores		Eigenvalores ^{U1}		Eigenvectores	
-3.5451		0.7920 0.6105		-1.1667		0.6834 0.7254	
-21.0163		-0.6105 0.7920		-4.7164		0.7254 -0.6884	
Valores predichos							
g	E.E. ^Z	Kg ha ⁻¹	L ha ⁻¹	cm	E.E. ^Z	Kg ha ⁻¹	L ha ⁻¹
165.4	9.291	375.0	15.0	74.0	1.563	375.0	15.0
165.1	9.253	351.3	16.2	73.8	1.552	342.2	15.7
164.4	9.128	328.3	17.3	73.6	1.528	312.6	16.7
163.2	8.923	305.4	18.5	73.3	1.494	284.1	17.7
161.6	8.652	282.4	19.7	72.9	1.442	256.1	18.7

159.6	8.339	259.5	20.9	72.4	1.387	228.4	19.7
157.2	8.019	236.6	22.1	71.8	1.329	200.8	20.7
154.4	7.743	213.7	23.3	71.1	1.278	173.3	21.8
151.2	7.576	190.8	24.5	70.3	1.245	145.9	22.7
147.5	7.597	167.9	25.7	69.5	1.242	118.5	23.8
143.4	7.882	145.0	26.8	68.5	1.283	91.1	24.8
Incrementos (+) decrementos (-) con respecto a la media simple							
+15.3	(inverso)	+158.6	-44.1	+8.0	(inverso)	+75.7	-65.3

^xAnálisis de cordillera (Ridge); μ Media general, C.V. Coeficiente de variación, R^2 Coeficiente de determinación. ^wprobabilidad de F: $Pr \geq 0.05$ No significativo, Significativo $0.05 \leq Pr \leq 0.01$, altamente significativo $Pr \leq 0.01$ ^yRespuesta ($Pr > |t|$) significativa lineal (L), cuadrática (C), productos significativos de ese nutriente con el resto; ^zError estándar, ^uSi los eigenvalores son ambos negativos el punto estacionario es un máximo, sin ambos son positivos el punto estacionario es un mínimo, de otra manera es un punto silla; ^vdatos decodificados.

La aplicación de carbonato de calcio inicio el 12 de julio tanto al suelo como en aspersión foliar y ésta última con cuatro aplicaciones terminó el 16 de agosto, estamos hablando de un lapso de dos meses antes de cosecha, hubo respuesta para ambos, lo que en un supera el concepto de que las aplicaciones al suelo de calcio no son efectivas por un lado y que las aspersiones de calcio como carbonato representan una opción considerablemente más económica para nutrir de calcio a la planta y fruto su contenido de calcio es semejante a aquél de cloruro de calcio alrededor del 35.0%, ambos pueden complementarse para mejorar su incorporación en la planta, esto significa que estaríamos transitando de una enmienda a un fertilizante natural que se puede aplicar directamente al suelo, vía fertirrigación, en aspersión foliar e inclusive en inmersión de fruto, lo que abre un parteaguas en el suplemento de calcio, cuya carencia como se mencionó, se ha ido agravando con el tiempo a tal grado que es una exigencia de los compradores de manzano que se tenga un suplemento de calcio para asegurar la resistencia

al empaque sin daño al fruto y que además tenga capacidad de almacenamiento y vida de anaquel. En la **Figura 1** vemos una respuesta consistente tanto en la aplicación al suelo como en aspersión foliar, con el mayor tamaño de fruto con aproximadamente 375.0 kg vía edáfica y 15.0 kg en aspersión foliar de carbonato de calcio, que coincide con el mayor tamaño de fruto alcanzado (**Cuadro1**).

La **Figura 2**, muestra la respuesta del contenido de sólidos solubles totales, el menor contenido de sólidos solubles con 14.3 °Brix (y por lo tanto menor grado de maduración) fue aproximadamente con aquellas cantidades de carbonato de calcio asociadas a la mejor respuesta con tamaño de fruto, esto es muy importante pues las variedades rojas como Top Red, siguen transformando azúcar a almidón después de cosecha que puede reflejarse en una sobremaduración sobre todo cuando la acidez titulable es baja (Bartram, 1980, Hammet, 1980, Sánchez, 1999) lo que ocasiona una alta relación azúcar acidez muy asociada con manzana poco jugosa con una percepción de harinosidad, es decir una manzana sobremadura que ya no conserva el sabor característico de la variedad

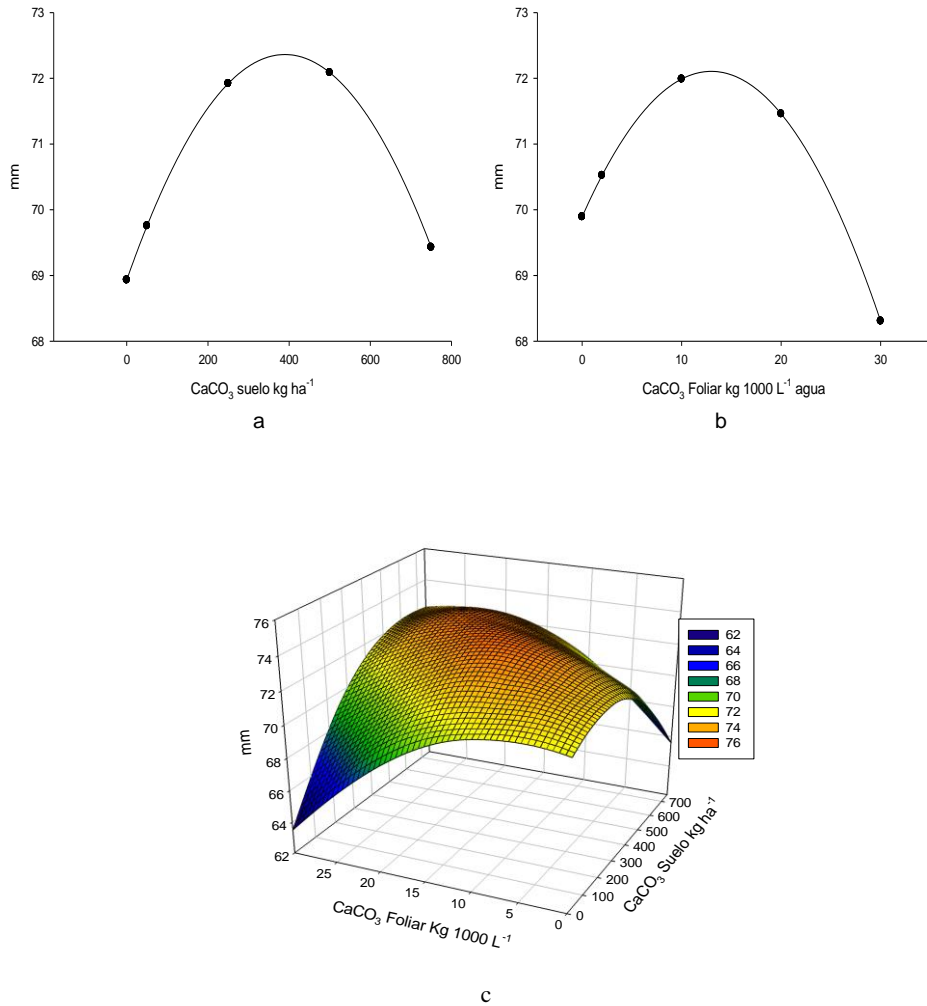


Figura 1 • Efecto de carbonato de calcio aplicado al suelo (a) en aspersión foliar (b) y sinergismo entre ambos (c) sobre el diámetro de fruto de manzana 'Top Red'.

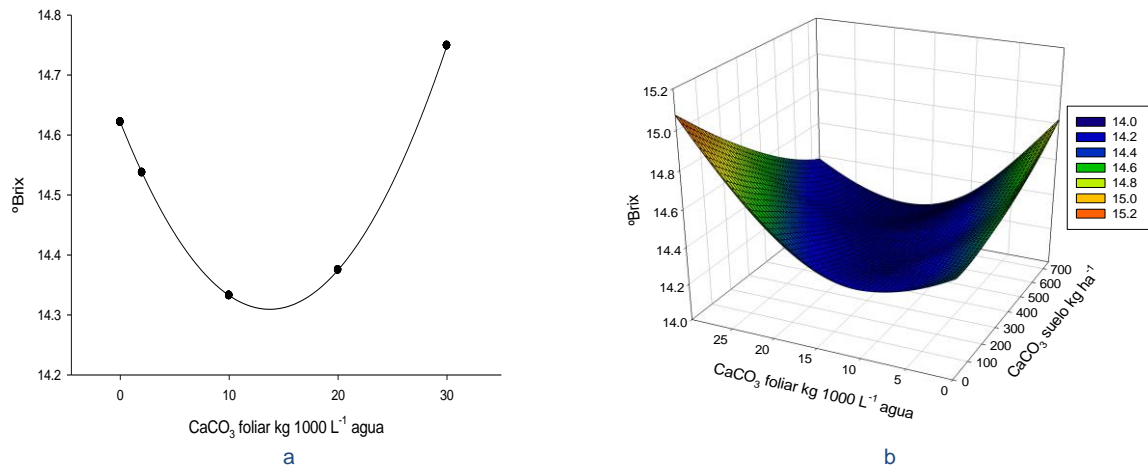


Figura 2 • Contenido sólidos solubles totales de fruto de manzana 'Top Red' en postcosecha, tratado con carbonato en aspersión foliar de calcio (a) e interacción con las aplicaciones con las aplicaciones al suelo (b).

En el **Cuadro 2** se muestra el resumen para las variables analizadas en cosecha y postcosecha, los eigenvalores se expresan como porcentaje de la media y los eigenvectores se ponderan en múltiplos a partir de 0.25; para cosecha, de ocho variables evaluadas, aquellas cuya frecuencia de eigenvectores positivos mayor al 25% respecto de la frecuencia total promedio de 36, es decir 9; cinco variables registraron frecuencia mayor o igual a 9: diámetro de fruto, firmeza de la pulpa, sólidos solubles totales, relación azúcar acidez y producción; el valor mínimo para carbonato de calcio aplicado al suelo fue de 375.0 kg ha⁻¹ para diámetro de fruto y el máximo de 737.0 kg ha⁻¹ para sólidos solubles totales.

De la misma manera, para la aspersión foliar de carbonato de calcio en esas variables seleccionadas, el valor mínimo se registró para producción con 7.5 y el máximo de 18.9 kg CaCO₃ 1000 L⁻¹ agua para sólidos solubles totales, entonces, la recomendación de ambos en términos de media simple sería de 556.0 kg de carbonato de calcio por hectárea vía al suelo y 13.2 kg de carbonato de calcio por 1000 litros en aspersión foliar con 4 aplicaciones foliares como mínimo, lo que se reflejará en un mayor tamaño y firmeza de fruto, menor contenido de sólidos solubles y más baja relación azúcar acidez acompañadas con un incremento en la producción.

En este año la manzana estuvo más madura (caída precosecha muy fuerte, alrededor del 65 a 70%, asociada con defoliación intensa mayor al 65%) con presencia de gran cantidad de fruto con el desorden de corazón de agua -water core- mayor al 45%, se reflejó en los valores registrados para firmeza de la pulpa con 12.4 a 13.3 lb in², cuando en años normales al tiempo de cosecha generalmente el fruto es más firme con valores por encima de las 16.5 y hasta 18.5 lb in²; contenido de sólidos solubles totales de 12.0 a 13.5 °Brix, acidez titulable promedio de 0.5 % o mayor de ácido málico, relación azúcar

acidez entre 30.0 y 35.0, bajo éstas condiciones la manzana deberá ser destinada a consumo inmediato ya que al refrigerarla perderá muy pronto sus atributos de calidad, inclusive por debajo de la Norma Mexicana NMX-FF-061-SCFI-2003 para Productos Agrícolas no Industrializados para Consumo Humano – Fruta Fresca – Manzana (*Malus pumila* Mill) – (*Malus domestica* Borkh) (2003). Esta situación también pudo ser agravada por la edad de los árboles plantados en 1986, que presentan ataque de medio a severo de tizón de fuego lo que ido ocasionando se tengan que cortar ramas completas lo que deja al árbol debilitado y más susceptible al daño de esta bacteria que inicia desde floración.

Este es el segundo año que ‘Top Red’ presentó excesiva defoliación y caída de fruto previo a cosecha junto con presencia del desorden fisiológico corazón de agua en fruto que aumenta considerablemente el contenido de sólidos solubles, la primera debida a la presencia de ataque severo muy probablemente de los hongos *Botryosphaeria sp* (moteado irregular en la mayor parte de las hoja cubriendo casi la totalidad de la masa foliar) y *Alternaria sp* (moteado concéntrico) ambas especies resultado de las excesivas lluvias registradas desde finales de julio y durante la mayor parte de agosto. Este problema que apareció en ‘Golden Delicious’ en 2006 y causó crisis en 2009 al dañar al fruto con la aparición del temible “punto rojo”, se empezó a manifestar en Top Red a partir de 2014, recrudesciéndose en 2016 y 2017 (2015 no fue lluvioso en agosto), si bien por ser una variedad roja queda encubierto el punto rojo sin repercusiones sobre la apariencia del fruto, afecta su calidad (sobremaduración) y producción con la presencia de corazón de agua, elevado contenido de sólidos solubles y disminución considerable de producción por la excesiva caída de precosecha. Estos desórdenes se han manifestado muy probablemente por el

cambio climático que ha ocasionado lluvias abundantes y elevada humedad relativa durante el mes de agosto.

Cuadro 2 • Comportamiento calidad de fruto en cosecha y postcosecha en manzano Top Red tratado con carbonato de calcio en aplicación al suelo y aspersión foliar

Cosecha											
Suelo ^V			Foliar ^V			Suelo			Foliar		
	Peso	Frec		Diámetro	Frec		Color	Frec			
-2.3 ^W	+++	++	5/0	-1.7	+++	+++	6/0	3.5	++++		4/0
-13.9	--	+++	3/2	-6.7	+++	---	3/3	1.5		++++	4/0
Frec.+/-	3/2	5/0	8/2		6/0	3/3	<u>9/3</u>		4/0	4/0	8/0
Conc.	375.0	15.0			375.0	15.0		735.4	10.9		
Firmeza pulpa				Sólidos solubles totales (SST)				Acidez titulable			
5.6	++++	-	4/1	2.9	-	++++	4/1	1.0	--	+++	3/2
3.4	+	++++	5/0	0.1	++++	+	5/0	-1.9	+++	++	5/0
Frec.+/-	5/0	4/1	<u>9/1</u>		4/1	5/0	<u>9/1</u>		3/2	5/0	8/2
Conc.	714.7	8.6			737.0	18.9		167.5	27.5		
SST / acidez titulable				Producción							
2.4	+++	++++	7/0	-11.2	++++	+	5/0				
1.2	++++	---	4/3	-19.7	-	++++	4/1				
Frec.+/-	7/0	4/3	<u>11/3</u>		4/1	5/0	<u>9/1</u>				
Conc.	733.6	10.6			375.7	7.5					
Resumen											
	Columnas	36/6	35/7		Filas	38/4	33/9				
	Mínimo	375.0	7.5								
	Máximo	737.0	18.9								
Postcosecha											
Color			Firmeza pulpa			SST					
7.2	++++		4/0	-1.9	-	++++	4/1	-0.4	+++	--	3/2
2.0		++++	4/0	-2.6	++++	+	5/0	-1.8	++	+++	5/0
Frec.+/-	4/0	4/0	<u>8/0</u>		4/1	5/0	<u>9/1</u>		5/0	3/2	<u>8/2</u>
Conc.	704.3	7.8			452.8	0.3		652.0	25.1		
Acidez titulable			SST / acidez titulable								
1.5	++++		4/0	0.04	++++	++++	4/0				
-1.9		++++	4/0	-2.9	++++		4/0				
Frec.+/-	4/0	4/0	<u>8/0</u>		4/0	4/0	<u>8/0</u>				
Conc.	720.1	9.1			736.9	11.1					
Resumen											
	Columnas	21/1	20/2		Filas	19/3	22/0				
	Mínimo	452.8	0.3								
	Máximo	736.9	25.1								

^VCaCO₃ kg ha⁻¹ en aplicación al suelo y CaCO₃ kg 1000 L⁻¹ agua en aspersión foliar, los valores inferiores indican la media simple, ^WEigenvalores como porcentaje de la media, si ambos son positivos la solución es un mínimo, si son negativos la solución es un máximo, de otra manera es un punto silla; dosis para cada variable están a partir de la media simple;; ^Ytipo de respuesta observada, L lineal, C cuadrática, P interacción de productos; frecuencia (F +/-cada signo equivale a 0.25 redondeado al valor más próximo) en grises corresponde a las variables que son mayores al 25% en relación a la frecuencia total^Z promedio de (+) en resumen.

Generalmente se espera que las aplicaciones de calcio muestren mejor su efecto durante postcosecha puesto que es ahí donde se deben reflejar en una mayor firmeza, menor contenido de sólidos solubles, mayor acidez titulable y menor azúcar acidez que en su conjunto nos darían una manzana con el sabor típico de la variedad, más fresca, jugosa y crujiente que pueda sortear favorablemente la vida de anaquel y estar en las mejores condiciones para el consumidor, partiríamos entonces de una mejor calidad de almacenamiento (Wojcik, 2002).

Para calidad del fruto en postcosecha (**Cuadro 2**), la manzana ya se encontraba en un estado avanzado de madurez, los valores registrados dan prueba de ello, firmeza de 10.2 a 10.6 lb in², acidez titulable de 0.227 a 0.235% de ácido málico y una relación azúcar acidez muy elevada de 62 a 65.0; la frecuencia promedio de eigenvectores + fue de 20, lo que indica que las frecuencias relativas para cada variable mayores a 5 entran en la selección; todas la variables fueron seleccionadas, lo que muestra la consistencia del efecto de las aplicaciones de carbonato en precosecha, es más, aquellas variables que se consideran estrellas del almacenamiento y vida de anaquel, firmeza (Aggelopoulou *et al.*, 2010) y acidez titulable (Angón-Galván *et al.*, 2006, Soto *et al.* 2014) fueron afectadas significativamente por las aplicaciones de carbonato de calcio vía suelo que interactuaron con las aspersiones foliares del mismo.

En la **Figura 3** observamos la superficie de respuesta para firmeza de la pulpa que muestra tendencia cuadrática con un óptimo alrededor de los 400 kg ha⁻¹ de carbonato de calcio y presenta antagonismo a dosis altas en aspersión foliar, de ahí que el valor más alto se consiga con sólo 0.3 kg de CaCO₃ por 1000 L⁻¹ de agua, mientras que para acidez titulable (**Figura 4**) la respuesta fue evidente para las aplicaciones al suelo, pero aquí se incrementa la acidez conforme aumenta la

concentración de aplicación al suelo sin mostrar que haya llegado a un límite, en cambio la acidez disminuye de manera pronunciada cuando la concentración de aspersión foliar es mayor a los 10 kg de CaCO₃ 1000 L⁻¹ agua, esto puede ampliar el alcance de las aspersiones foliares ya que en estudio previo (Soto *et al.*, 2016) el carbonato de calcio en aspersión foliar a una dosis de 20 kg 1000 L⁻¹ agua compitió eficazmente con la mayor parte del espectro de presentaciones comerciales de calcio.

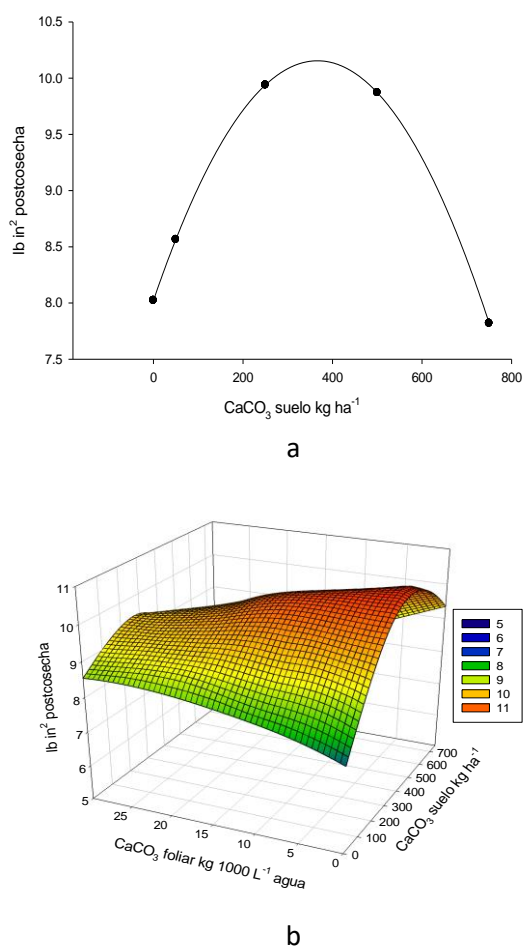


Figura 3 • Firmeza de la pulpa de fruto de manzana ‘Top Red’ en postcosecha, tratada con carbonato de calcio vía suelo (a) e interacción con las aspersiones foliares (b).

Éstos resultados como se ya se mencionó rebasan la creencia de que las aplicaciones de calcio al suelo no son una alternativa para mejorar la calidad del fruto, además las

aspersiones foliares tienen un efecto concurrente para mejorar la calidad de fruto en cosecha y postcosecha y sobre aquellas lo que representa una esperanza postcosecha.

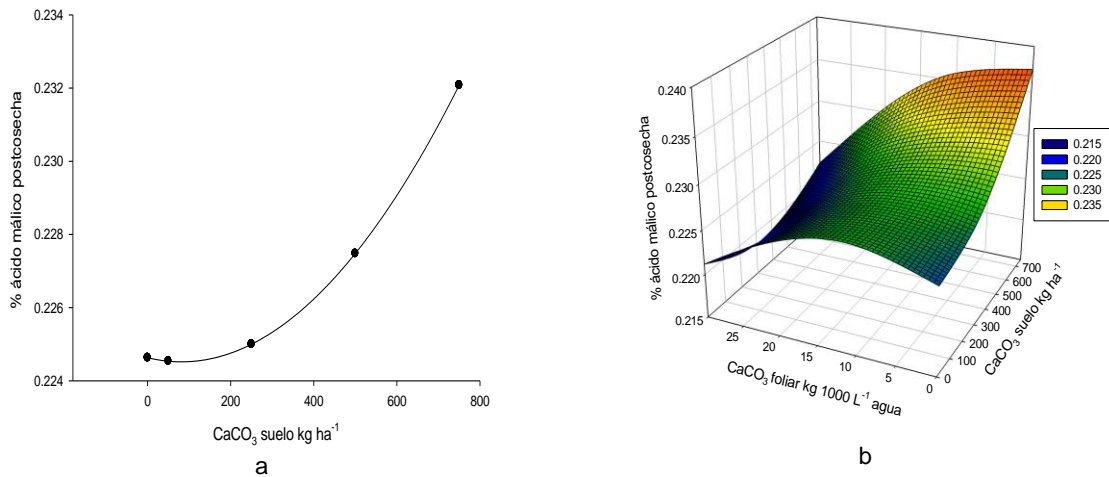


Figura 4 • Acidez titulable de fruto de manzana "Top Red" en postcosecha tratada con carbonato de calcio vía suelo (a) y antagonismo con aspersiones foliares (b).

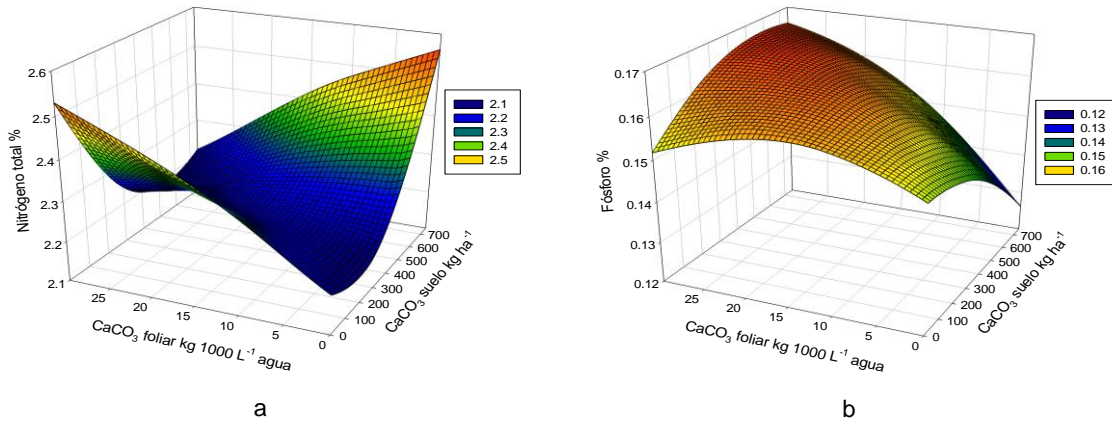


Figura 5 • Interacción entre las aplicaciones al suelo y aspersiones foliares de carbonato de calcio sobre el contenido foliar para nitrógeno (a) y fósforo (b) en manzana "Top Red".

3.4.1 Contenido nutricional foliar

Mejorar el contenido nutricional foliar con fertilización de calcio al suelo de manera concurrente con aspersiones foliares es una premisa para aumentar, mantener producción, calidad, capacidad de almacenamiento y una razonable vida de anaquel; de esta manera, se asegurará la permanencia en el mercado, un nivel adecuado de rentabilidad que permita reinversión en infraestructura y tecnología de

producción para estar en condiciones de sortear las inclemencias del tiempo agravadas por el cambio climático, ello se reflejará en que la mayor parte de año haya disponibilidad de fruto fresco, dulce, crujiente y jugoso, lo que permitirá competir en tiempo y espacio con la manzana americana; sin duda el aporte de calcio juega un papel esencial en ello, concatenado con la exigencia de parte de los empaques y comercializadores de manzana.

El resumen para contenido nutricional foliar se muestra en el **Cuadro 3**, nitrógeno (y nitratos), los cationes potasio, calcio y magnesio, micronutrientes manganeso y zinc se ubicaron por encima del rango de suficiencia según los valores reportados por Soto *et al.* (2008), mientras que fósforo y cobre estuvieron deficientes.

A su vez todos los nutrientes por encima del rango de suficiencia mostraron respuestas significativas muy consistentes a excepción de nitrógeno a las aplicaciones de carbonato de calcio suelo y foliares, para éste se registró interacción entre ambos tipos de aplicación según se muestra en la **Figura 5a**, el contenido más alto de nitrógeno se alcanzó de manera individual con cualquiera de los dos tipos de aplicaciones a las concentraciones de aplicación más altas -más evidentes con las aplicaciones al suelo- a su vez el nivel más bajo fue cuando se conjuntaron las aplicaciones a esos niveles más altos, sin embargo el rango de exploración cayó por encima del rango suficiente encontrado por Soto *et al.* (2008) de 1.36 a 1.93% de nitrógeno por lo que se tiene un margen de flexibilidad e inclusive las aspersiones conjuntas de carbonato de calcio aplicado al suelo, aproximadamente 500 kg ha⁻¹ y 15 kg 1000 L⁻¹ de agua en aspersión foliar bien pudieran ser una estrategia para ralentizar el contenido foliar de nitrógeno, pues cuando éste se encuentra en exceso puede traer condiciones indeseables sobre la calidad de la fruta (Nave *et al.*, 2008), esto permitiría a su vez aumentar el contenido de fósforo (**Figura 5b**) que si bien las aplicaciones al suelo disminuyen su contenido foliar, las aspersiones foliares lo aumentan y a medida que se incrementan los dos a niveles como los reportados para nitrógeno se eleva el contenido de fósforo, aproximándose a 0.18% el nivel mínimo del rango de suficiencia (Soto *et al.*, 2008).

La **Figura 6** muestra el contenido foliar de potasio como es afectado de manera diferente con las aplicaciones al suelo, inicia con un decremento hasta los 250 kg ha⁻¹ a partir del cual se incrementa a medida que aumenta la concentración de carbonato de calcio hasta llegar a 1.60% con la nivel más alto de aplicación de 700 kg ha⁻¹; sucede lo contrario con las aspersiones foliares pues a medida que aumenta la concentración de aplicación disminuye el contenido de potasio y alrededor de los 20 kg ha⁻¹ empieza a incrementarse hasta llegar alrededor de 1.50%; la interacción entre **ambos tipos de aplicación se muestra en la Figura 6c**, el rango de suficiencia para potasio varía de 0.97 a 1.38% (Soto *et al.* 2008), el valor de 1.38% si bien no se obtuvo con las aplicaciones de manera individual, en aplicaciones conjuntas con alrededor de 300 kg ha⁻¹ y 15 kg 1000 L⁻¹ agua se aproxima a ese valor por lo que nuevamente las aplicaciones conjuntas pueden contribuir a ralentizar el contenido nutricional foliar de potasio y con ello tratar de paliar el desorden fisiológico corazón de agua en el fruto de manzana lo que ha ocasionado sobremadurez del fruto y elevada caída de fruto previo a cosecha que muestra un elevado contenido de azúcares, producto entre otros de días calurosos y noches frescas, bajo contenido de calcio y la relación que este guarda con potasio y magnesio; entonces las aplicaciones foliares de calcio bien pueden o no concurrir con las aplicaciones al suelo ya que éstas últimas elevan el contenido de micronutrientes y podría ser una premisa para también biofortificar con zinc al fruto.

Una manera de ralentizar el corazón de agua, en principio es elevar el nivel de calcio en hoja y probablemente magnesio para como cationes tratar de paliar el efecto de potasio, el efecto de las aspersiones foliares de calcio para complementar las aplicaciones al suelo se muestran en las **Figuras 7 a, b y c**.

Cuadro 3 • Comportamiento para contenido nutricional foliar en manzano Top Red tratado con carbonato de calcio en aplicación al suelo y aspersión foliar

Macronutrientes											
Suelo ^V Foliar ^V				Suelo Foliar				Suelo Foliar			
Nitrógeno total				Nitratos				Fósforo			
(0.652 – 0.848) ^X				(1885.2 – 1527.4)				(0.162 – 0.167)			
8.6 ^W	++++	-	4/1	-1.4	+++	--	3/2	-1.3	+++	+++	6/0
-2.6	+	++++	5/0	-15.8	++	+++	5/0	-7.7	---	+++	3/3
F+/-	5/0	4/1	9/1	5/0	3/2	8/2		3/3	6/0	9/3	
Resp. ^Y	P							P			
Dosis	726.9	9.8		320.8	0.2			549.5	28.3		
Potasio				Calcio				Magnesio			
(1.38 – 1.42)				(1.41 – 1.47)				(0.306 – 0.312)			
7.8	+++	---	3/3	-4.5	++++		4/0	8.1	++++	+	5/0
4.0	+++	+++	6/0	-21.9		++++	4/0	-11.6	-	++++	4/1
F+/-	6/0	3/3	9/3		4/0	4/0	8/0		4/1	5/0	9/1
Resp.	C, P	L, C				L, C			L, P		
Dosis	9.7	11.6		747.8	16.6			307.1	29.8		
Sodio				Resumen							
(0.0125 – 0.0146)											
5.9	+	++++	5/0					Columnas	32 ^Z /4	29/7	Filas
-10.1	++++	-	4/1								30/6
F+/-	5/0	4/1	9/1								31/5
Resp.											
Dosis	577.1	27.6						Mínimo	9.7	9.8	
								Máximo	747.8	29.8	

Micronutrientes											
Fierro				Manganeso				Zinc			
(96.1 – 88.8)				(77.1 – 81.6)				(36.8 – 49.6)			
4.4	+	++++	5/0	10.3	++	+++	5/0	23.4	++++	--	4/2
-4.2	++++	-	4/1	7.4	+++	--	3/2	15.6	++	++++	6/0
F+/-	5/0	4/1	9/1		5/0	3/2	8/2		6/0	4/2	10/2
Resp.					L, C	L, C			L, C	L, C	
Dosis	655.7	5.1		301.5	29.7			700.7	7.6		
Cobre				Resumen							
(4.7 – 5.3)											
8.1	++++		4/0					Columnas	20/0	15/5	Filas
2.1		++++	4/0								18/2
F+/-	4/0	4/0	8/0					Mínimo	301.0	4.6	17/3
Resp.											
Dosis	645.0	4.6						Máximo	700.7	29.7	

^VCaCO₃ kg ha⁻¹ en aplicación al suelo y CaCO₃ kg 1000 L⁻¹ agua en aspersión foliar, los valores inferiores indican la media simple, 375.0 y 15.0 respectivamente; ^WEigenvalores como porcentaje de la media, si ambos son positivos la solución es un mínimo, si son negativos la solución es un máximo, de otra manera es un punto silla; dosis para cada variable están a partir de la media simple; ^Xrango para los valores predichos, negrillas por debajo del intervalo de suficiencia, subrayado por encima, de otra manera es suficiente (Soto et al. 2008); ^Ytipo de respuesta observada, L lineal, C cuadrática, P interacción de productos; frecuencia (F +/-) cada signo equivale a 0.25 redondeado al valor más próximo) en grises corresponde a las variables que son mayores al 25% en relación a la frecuencia total^Z promedio de (+) en resume

El mayor contenido de calcio (**Figura 7a**) de 1.35% se alcanza con 15 kg de carbonato de calcio 1000 L⁻¹ de agua, arriba del reportado por Soto *et al.* (2008) con un intervalo suficiente de 0.92 a 1.31%, Faust (1980) reporta que para que haya un buen nivel de calcio en el fruto el contenido foliar deberá ser de 2.0% de calcio, este nivel muy probablemente se alcance con aplicaciones continuas de carbonato de calcio

aplicados al suelo complementado con aspersiones foliares.

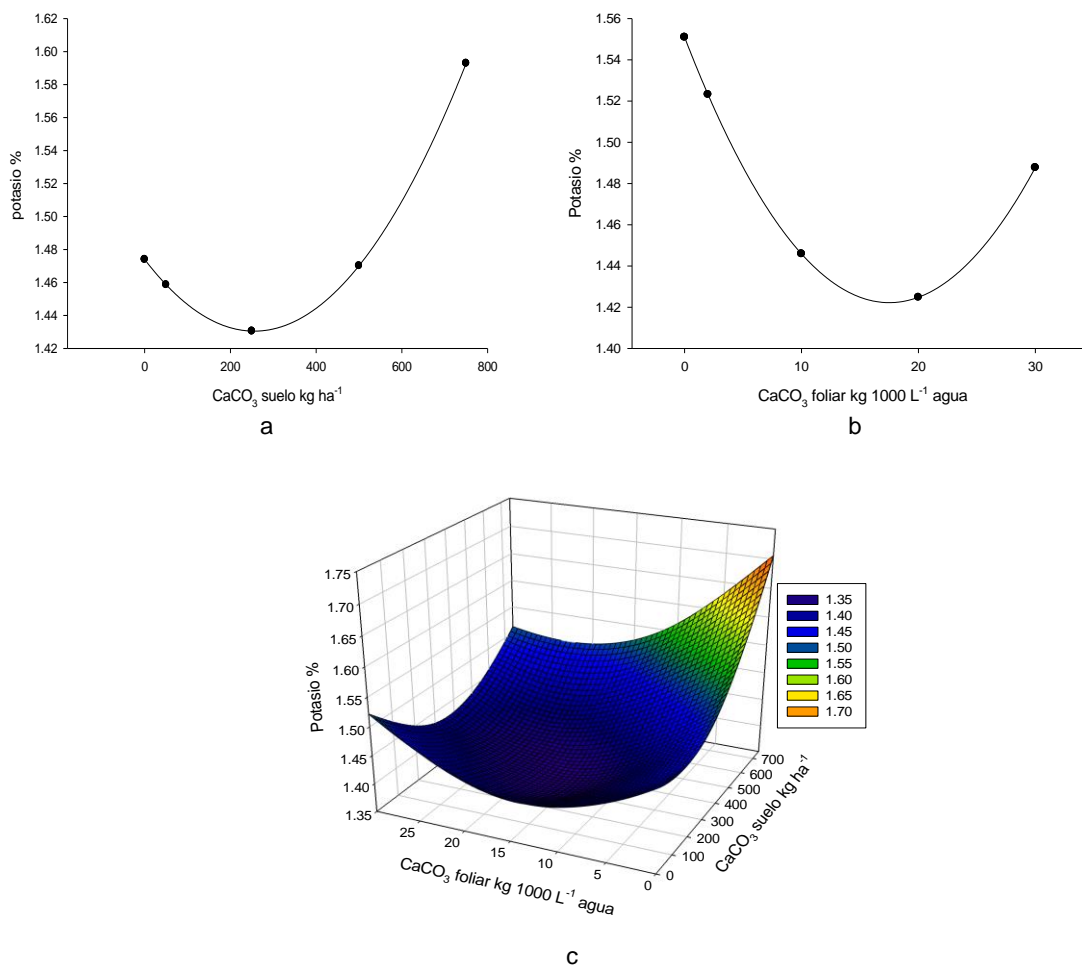


Figura 6 • Efecto de las aplicaciones de carbonato de calcio aplicado al suelo (a), en aspersión foliar (b) y antagonismo entre ambas (c) sobre el contenido nutricional de potasio en manzana 'Top Red'.

El contenido de magnesio se incrementó conforme aumentó la concentración de carbonato de calcio en aplicación edáfica (**Figura 7b**), hasta alcanzar 0.39% por encima del rango reportado por Soto *et al.* (2008) de 0.19 a 0.27%, el valor superior del intervalo lo muestran las aspersiones foliares (**Figura 7c**), nuevamente las aplicaciones foliares actúan concurrentes en el contenido foliar cuando se incrementa debido a las aplicaciones a suelo, esto podría énfasis que las aplicaciones foliares de calcio son complementarias de aquellas del suelo y no única alternativa de suplemento de calcio al manzano, se constata en el caso de la

calidad cosecha y postcosecha (**Cuadro 2**), la mejor respuesta para las variables estrella de calidad y capacidad de almacenamiento (firmeza de la pulpa, sólidos solubles y acidez titulable) se consiguen con alrededor de 400 kg CaCO₃ ha⁻¹ y aspersiones foliares con aproximadamente 10 kg 1000 L⁻¹ agua, con la opción de incrementarlo hasta el doble para controlar el exceso de sólidos solubles totales, por lo que el efecto de las aplicaciones de carbonato de calcio contribuye directamente (cosecha y postcosecha) e indirectamente sobre la calidad del fruto a través de ralentizar el contenido nutricional foliar.

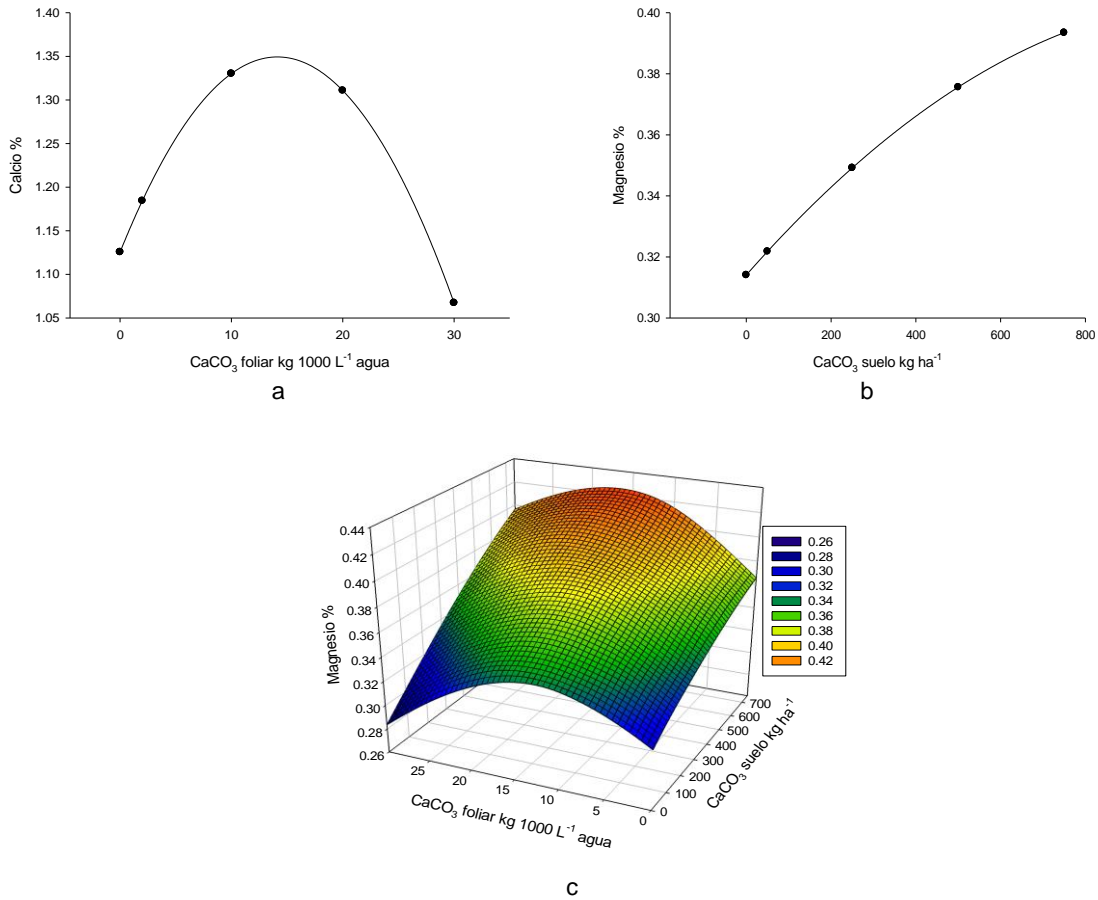


Figura 7 • Efecto de las aspersiones foliares de carbonato de calcio (a) sobre el contenido foliar de calcio; aplicaciones al suelo (b) y concurrencia entre ambas (c) sobre el contenido foliar de magnesio en manzano ‘Top Red’.

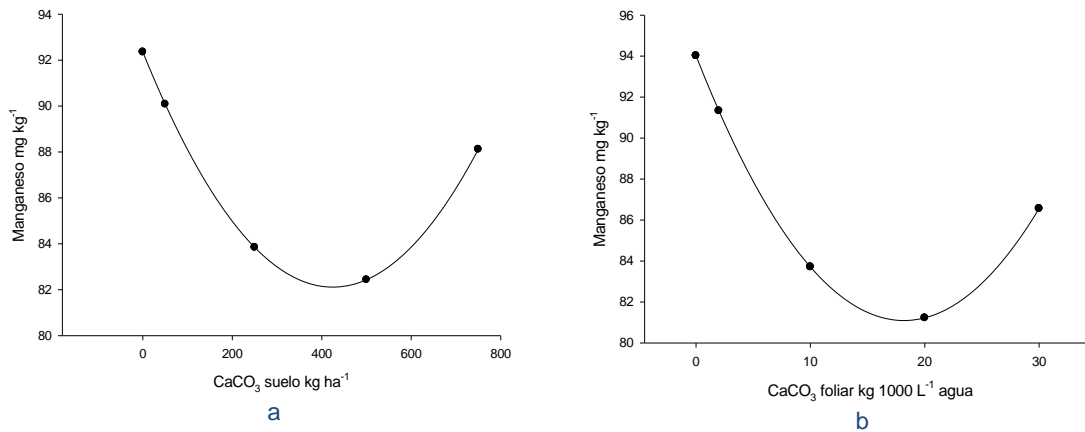


Figura 8 • Efecto de las aplicaciones de carbonato de calcio al suelo (a) y aspersión foliar (b) sobre el contenido foliar de manganeso en manzano ‘Top Red’.

Los niveles obtenidos de aplicación conjunta de micronutrientes principalmente manganeso carbonato de calcio vía edáfica y en aspersión (Figura 8) y zinc (Figura 9), ya que sus foliar implicarán el suplemento de

contenidos foliares disminuyen conforme se incrementa el nivel de las aplicaciones.

Se observa un incremento en los niveles de zinc conforme aumenta el nivel de aplicación de uno u otro tanto al suelo o en aspersión foliar, esto puede conllevar efectos benéficos para esta

variedad ya que un nivel adecuado de zinc puede reducir la transformación de acetaldehído a alcohol y por consiguiente el empardecimiento de la pulpa del fruto (Mengel y Kirkby, 1987, más ante la incidencia de corazón de agua.

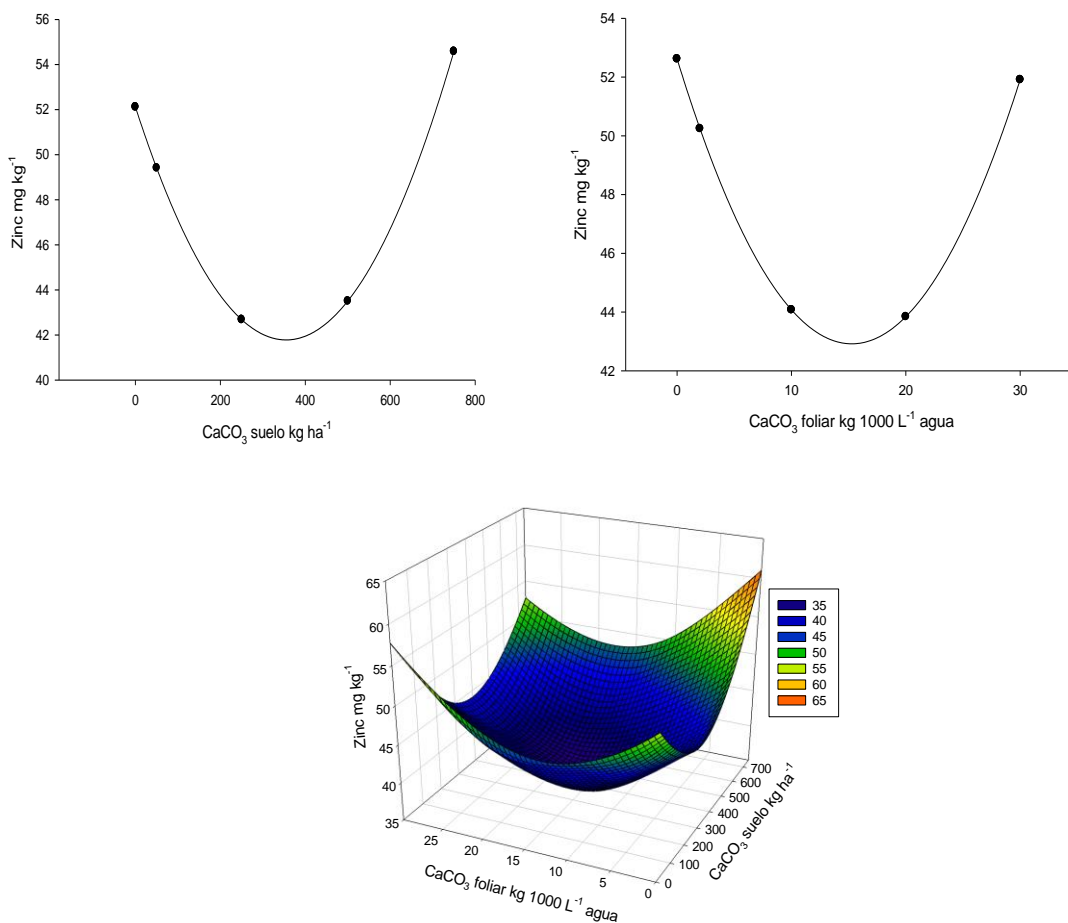


Figura 9 • Efecto de las aspersiones de carbonato de calcio aplicado al suelo (a), en aspersión foliar (b) y antagonismo entre ambas (c) sobre el contenido foliar de zinc en manzano 'Top Red'

3.4.2 Contenido nutricional en fruto

La calidad de la manzana y su capacidad de conservación en almacenamiento y anaquel es crucial para competir efectivamente con la manzana de importación; el contenido nutricional del fruto sin duda el aspecto clave a abordar, hasta ahora el enfoque ha sido principalmente con calcio mediante aspersiones foliares; sin embargo, la discusión presentada

señala la oportunidad de aplicaciones de calcio al suelo complementadas con aspersiones foliares con repercusiones a nivel foliar no nada más en ese nutriente. Por lo tanto, es necesario determinar si ese efecto trasciende también en el contenido nutricional del fruto, de ser así se visualiza un escenario atractivo además de la biofortificación, para definitivamente mejorar la

calidad de la manzana y todas implicaciones comerciales que ello conlleva.

El Cuadro 4 muestra el contenido de macro y micronutrientes en la pulpa del fruto, todo

parece indicar que los niveles alcanzados por el manejo del productor aseguran una manzana de calidad: contenido de fósforo, potasio, calcio, hierro y zinc estuvieron por encima del rango de

Cuadro 4 • Comportamiento para contenido nutricional pulpa de fruto de manzana Top Red tratado con carbonato de calcio en aplicación al suelo y aspersión foliar

Macronutrientes												
Suelo ^V Foliar ^V				Suelo Foliar				Suelo Foliar				
Nitrógeno total				Nitratos				Fósforo				
(0.652 – 0.848) ^X				(909.3 – 1028.1)				(0.091 – 0.120)				
22.9 ^W	++++		4/0	5.1	++++	++++	4/0	20.1	++++	+	5/0	
-5.8		++++	4/0	-7.4	++++		4/0	7.9	-	++++	4/1	
F+/-	4/0	4/0	8/0	4/0	4/0		8/0	4/1	5/0		9/1	
Resp. ^Y	L, C							L, C	L			
Dosis	749.1	13.9		323.5	29.9			26.3	9.5			
Potasio				Calcio				Magnesio				
(1.04 – 1.00)				(0.119 – 0.195)				(0.023 – 0.029)				
-5.9	++++	+	5/0	40.1	--	+++	3/2	18.9	+++	--	3/2	
-11.3	-	++++	4/1	20.3	+++	++	5/0	11.8	++	+++	5/0	
F+/-	4/1	5/0	9/1		3/2	5/0	8/2		5/0	3/2	8/2	
Resp.	C, P	L, C			C, P	L, C			C	C		
Dosis	737.8	18.8		208.7	28.4			720.9	9.2			
Sodio								Resumen				
(0.0172 – 0.0152)												
3.5	++++		4/0					Columnas	28 ^Z /4	30/2	Filas	
-7.0		++++	4/0								28/4	
F+/-	4/0	4/0	8/0								30/2	
Resp.												
Dosis	395.3	30.0						Mínimo	26.3	9.2		
								Máximo	749.1	30.0		
Micronutrientes												
Fierro				Manganeso				Zinc				
(47.9 – 69.1)				(1.33 – 0.86)				(6.7 – 8.4)				
34.8	++++		4/0	-9.8	++	+++	5/0	20.3	++++		4/0	
-14.8		++++	4/0	-34.5	+++	--	3/2	-10.5		++++	4/0	
F+/-	4/0	4/0	8/0		5/0	3/2	8/2		4/0	4/0	8/0	
Resp.	L, C	L, C							L, C	C		
Dosis	0.07	14.7		92.1	24.8			749.9	15.4			
Cobre								Resumen				
(0.34 – 3.39)												
96.0	++++		4/0					Columnas	17/0	15/2	Filas	
46.9		++++	4/0								17/0	
F+/-	4/0	4/0	8/0					Mínimo	0.07	4.6	15/2	
Resp.	L, C	L, C						Máximo	749.9	24.8		
Dosis	645.0	4.6										

^VCaCO₃ kg ha⁻¹ en aplicación al suelo y CaCO₃ kg 1000 L⁻¹ agua en aspersión foliar, los valores inferiores indican la media simple, 375.0 y 15.0 respectivamente; ^WEigenvalores como porcentaje de la media, si ambos son positivos la solución es un mínimo, si son negativos la solución es un máximo, de otra manera es un punto silla; dosis para cada variable están a partir de la media simple; ^Xrango para los valores predichos, negrillas por debajo del intervalo de suficiencia, subrayado por encima, de otra manera es suficiente (Soto et al. 2008); ^Ytipo de respuesta observada, L lineal, C cuadrática, P interacción de productos; frecuencia (F +/- cada signo equivale a 0.25 redondeado al valor más próximo) en grises corresponde a las variables que son mayores al 25% en relación a la frecuencia total^Z promedio de (+) en resumen.

suficiencia reportado por Soto *et al.* (2008), mientras que nitrógeno, magnesio, manganeso y cobre por debajo del intervalo de suficiencia; generalmente niveles altos de nitrógeno se asocian con frutos más verdes (Nave *et al.* 2008) e inmaduros en cosecha e inclusive predisposición a desórdenes fisiológicos por lo que es deseable controlar su contenido en fruto, caso semejante es para magnesio que si bien contribuye a una mejor firmeza del fruto (Mancera *et al.*, 2007), sus niveles no deben ser altos ya que se asocian con una predisposición al desorden de mancha amarga (bitter pit) en tanto que altos niveles de manganeso y cobre pueden incidir en roseteado de la epidermis del fruto lo que le resta valor comercial.

Por otra parte, niveles óptimos de fósforo pueden reflejarse en una mayor coloración del fruto y mayor contenido de azúcar; en 2017, el contenido de sólidos solubles totales fue relativamente alto con una media de 14.5 °Brix tanto en cosecha como en postcosecha, con alta incidencia de corazón de agua que ocasionó caída de fruto en precosecha y tendencia a sobremaduración en almacenamiento que se reflejó en una menor firmeza (8.8 lb in²), baja acidez titulable (0.223% de ácido málico) y muy elevada relación azúcar acidez (64.2). Se ha observado que mejorar el nivel de potasio influye en la calidad del fruto (Buts *et al.*, 2016, Dilmaghani *et al.*, 2004), puede reflejarse en un mayor contenido de acidez titulable, lo que da pauta para ralentizar la relación azúcar acidez y por consiguiente mejorar la capacidad de almacenamiento y anaquel. Las plantas requieren grandes cantidades de Ca para funciones estructurales en la pared celular y las membranas también como un contra-cation para aniones en la vacuola y críticamente para coordinar respuestas a señales de desarrollo y desafíos ambientales a través de los cambios en la concentración citosólica de calcio (White y Broadley, 2003).

Como se mencionó, si bien los niveles nutricionales en fruto fueron mayormente debido al manejo del productor, veamos como influyeron las aplicaciones de carbonato de calcio al suelo y en aspersión foliar sobre el contenido nutricional de la pulpa y si ello podría considerarse como una estrategia de doble propósito, biofortificación y mejoramiento de la calidad de fruto.

Nitrógeno fue afectado por las aplicaciones de carbonato de calcio al suelo (**Figura 10**), a bajo niveles hay una disminución conforme se incrementa la concentración al llegar a un punto de inflexión alrededor de los 400 kg de CaCO₃ ha⁻¹ a partir del cual aumenta el contenido de nitrógeno, esto es importante ya que el rango registrado fue deficiente lo que permitiría corregirlo.

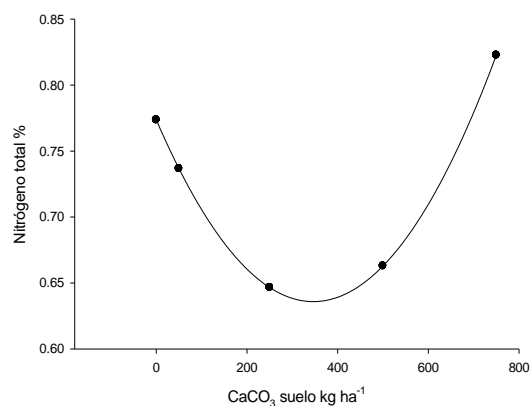


Figura 10 • Efecto de las aplicaciones de carbonato de calcio al suelo sobre el contenido de nitrógeno en la pulpa de fruto de manzana Top Red.

Mancera *et al.* (2007) encontraron que la manzana americana presenta un contenido de nitrógeno mayor que la manzana mexicana y ello probablemente contribuya a la sensación de frescura y mayor acidez titulable lo que contribuye a una mayor vida de anaquel; entonces, el carbonato afecta indirectamente calidad a través de la regulación de otros nutrientes, en este caso nitrógeno, lo que también podría ser válido en esta variedad para

fósforo (**Figura 11**) como estrategia para ralentizar el contenido de azúcar, evitar sobremaduración en sí mismo o como consecuencia del corazón de agua y a su vez equilibrar el contenido de ácido málico como el de azúcar (Dilmaghani *et al.*, 2004, Buts *et al.*, 2016) al aumentar de manera concurrente el contenido de potasio (**Figura 12**) todo esto muy probable se refleje en una mayor vida de anaquel. El efecto observado de carbonato de calcio sobre el aumento del contenido de

nitrógeno, fósforo, potasio y magnesio contradicen lo expuesto por Tonneto y Mitcham (2012). Las concentraciones tisulares de calcio, magnesio y potasio difieren notablemente entre los tejidos equivalentes de especies de plantas que crecen en el mismo entorno, la capacidad de muchas plantas para acumular Ca, Mg y K está correlacionada, y la variación filogenética en las concentraciones de magnesio se parece a las de calcio (Broadley y White, 2010).

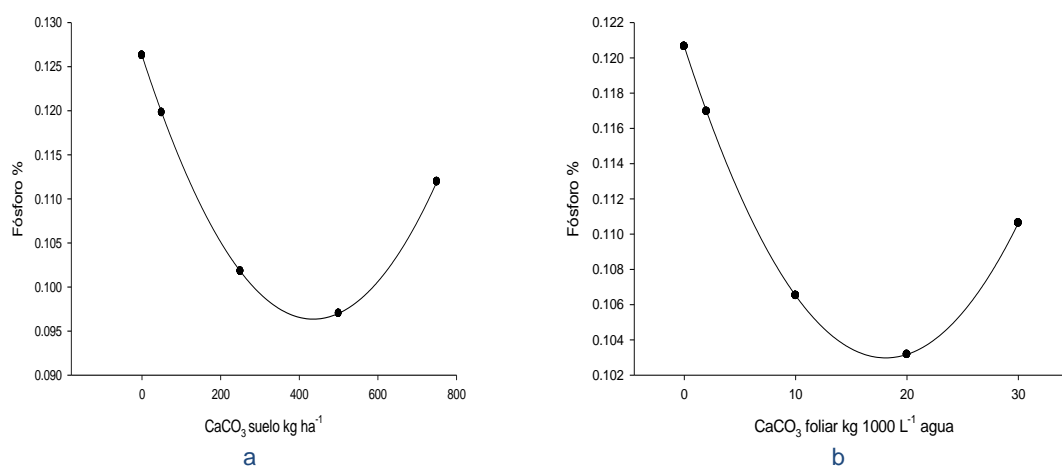


Figura 11 • Efecto independiente de las aplicaciones de carbonato de calcio al suelo (a) y en aspersión foliar (b) sobre el contenido de fósforo en la pulpa de fruto de manzana Top Red.

Podría ser una estrategia de biofortificación que el efecto de equilibrio y ralentizador de calcio, se muestre además de sí mismo, con otros nutrientes, a partir de un solo tipo de aplicación como se muestra en la **Figura 13**, ya que interactúan las aplicaciones al suelo y en aspersión foliar, más a dosis bajas en ambos casos, ya que conforme se incrementa la concentración de aplicación de uno u otro, se eleva el contenido en la pulpa del fruto hasta llegar al máximo contenido de 0.28% de calcio cuando se aplica de una u otra manera, entonces en principio es posible fortificar con calcio al fruto, para ello basta un tipo de aplicación, preferentemente aquellas al suelo por su contribución tanto en las propiedades de fertilidad del mismo que puedan llegar a asegurar un suplemento continuo del nutriente,

como por su efecto sobre los parámetros de calidad en cosecha y postcosecha al conservar la integridad de la membrana celular (Buts *et al.* 2016), así como el contenido foliar y de fruto tanto de otros macro y micronutrientes; en todo caso, las aspersiones foliares podrían ser complementarias (ya que muestran una tendencia similar con la respuesta a las aplicaciones edáficas) a aquellas del suelo, preferentemente a concentraciones medias de alrededor de 15.0 $\text{kg CaCO}_3 \text{ 1000 L}^{-1}$ agua, en tanto conjuntamente para suelo sería apropiado los 400 kg ha^{-1} , habrá que monitorear en años sucesivos si estos niveles serán constantes o bien habrá que disminuirlos conforme se logre equilibrio en suelo y planta, en caso de antagonismo, entre ambos tipos de aplicación, se

puede superar con dosis de 700 kg ha⁻¹ de carbonato de calcio aplicados al suelo.

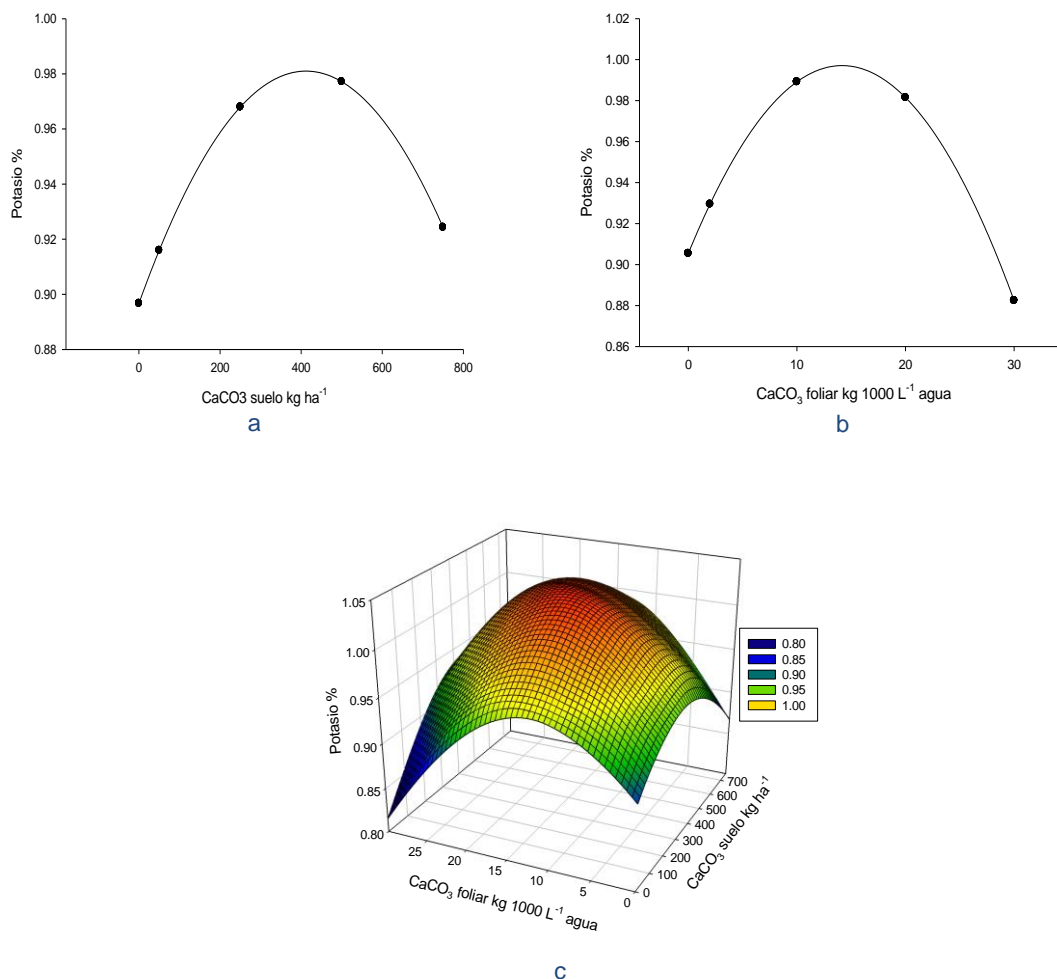


Figura 12 • Efecto de las aplicaciones de carbonato de calcio al suelo (a) y en aspersión foliar (b) y sinergismo entre ambas (c) sobre el contenido de potasio en la pulpa de fruto de manzana Top Red.

De esta manera se evitaría redundancia en la respuesta al contenido de nutrientes en pulpa de fruto para fósforo (Figura 11), manganeso (Figura 14), cobre (Figura 15); en tanto que serían complementarias y contribuirían a biofortificar con hierro (Figura 16) y zinc (Figura 17), lo que concuerda con Hermosillo - Cereceres *et al.* (2015) al biofortificar con selenio en cultivo de frijol aumentaron el contenido de hierro y zinc, en tanto que Sida *et al.*, 2014 lograron biofortificar frijol con zinc y hierro mediante el uso de quelatos de hierro y

zinc; cabe mencionar que no se observan efectos antagónicos sobre el contenido de micronutrientes por efecto de las aplicaciones de calcio como carbonato de calcio sino que por el contrario, a medida que aumenta la concentración de aplicación al suelo una vez superado el punto de inflexión, aumenta el contenido de micronutrientes en la pulpa de fruto, además las aspersiones foliares a bajas dosis de calcio pueden paliar el efecto de disminución inicial de las aplicaciones al suelo, lo que refuerza su carácter complementario.

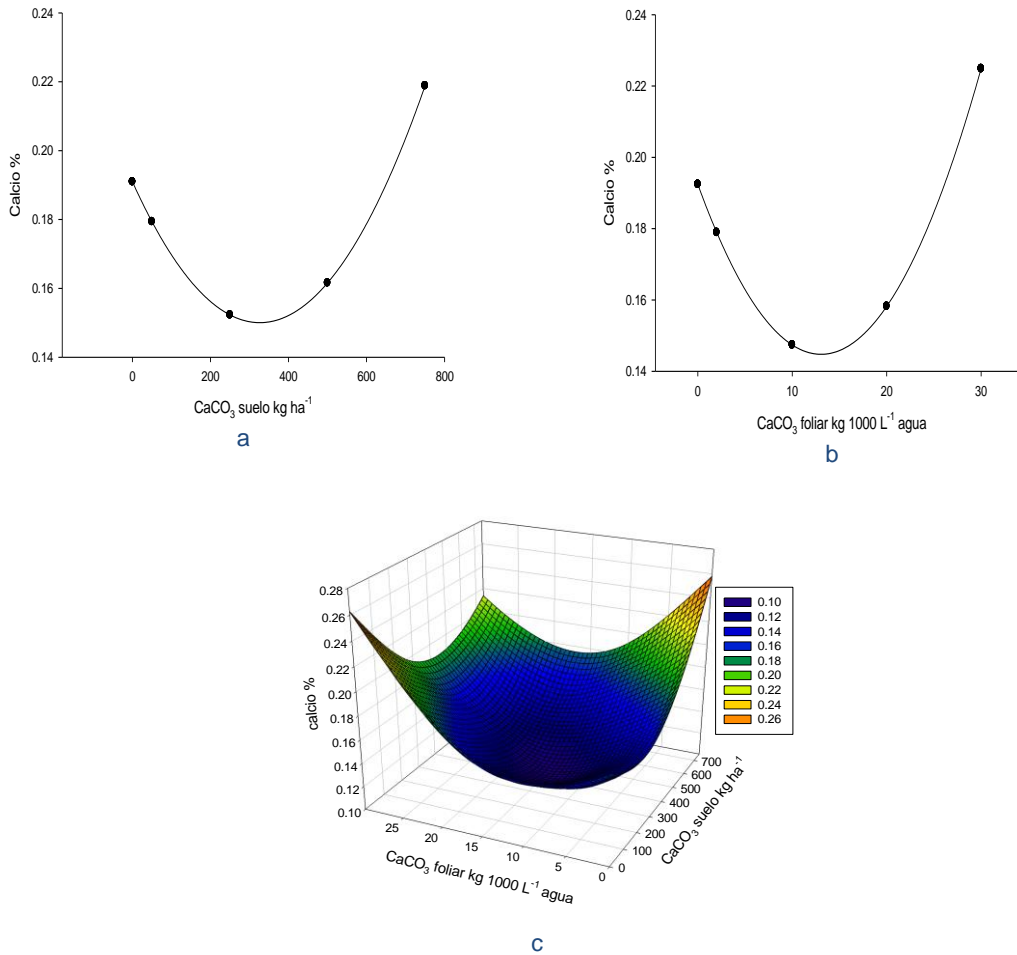


Figura 13 • Efecto de las aplicaciones de carbonato de calcio al suelo (a) y en aspersión foliar (b) y antagonismo entre ambas (c) sobre el contenido de calcio en la pulpa de fruto de manzana Top Red.

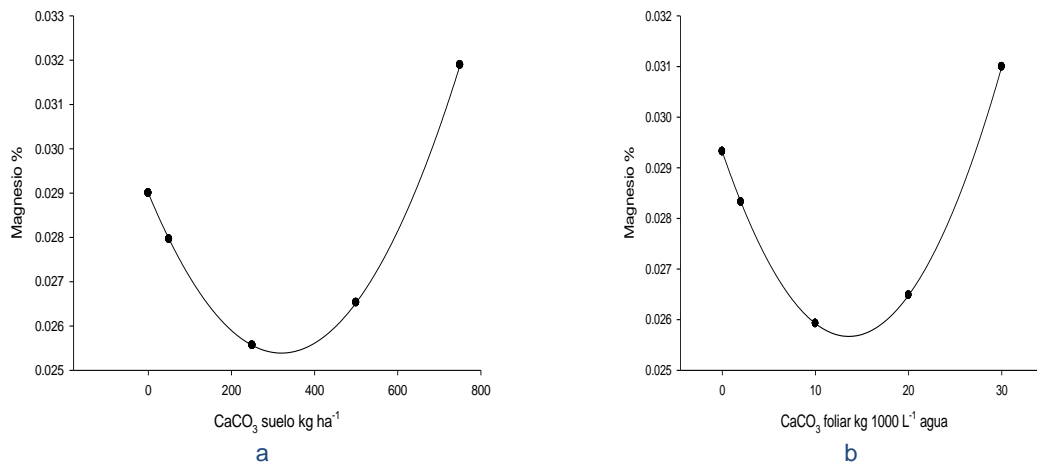


Figura 14 • Efecto independiente de las aplicaciones de carbonato de calcio al suelo (a) y en aspersión foliar (b) sobre el contenido de magnesio en la pulpa de fruto de manzana Top Red.

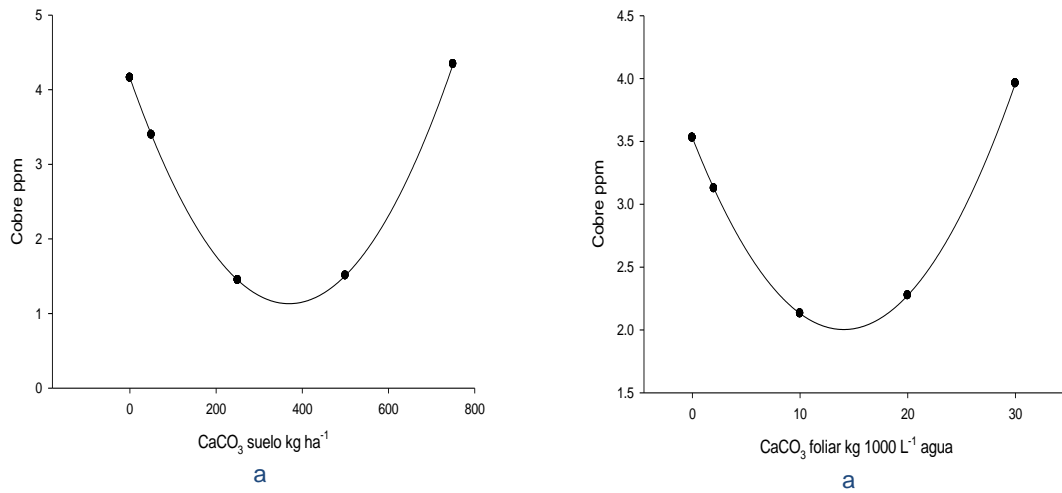


Figura 15 • Efecto independiente de las aplicaciones de carbonato de calcio al suelo (a) y en aspersión foliar (b) sobre el contenido de cobre en la pulpa de fruto de manzana Top Red.

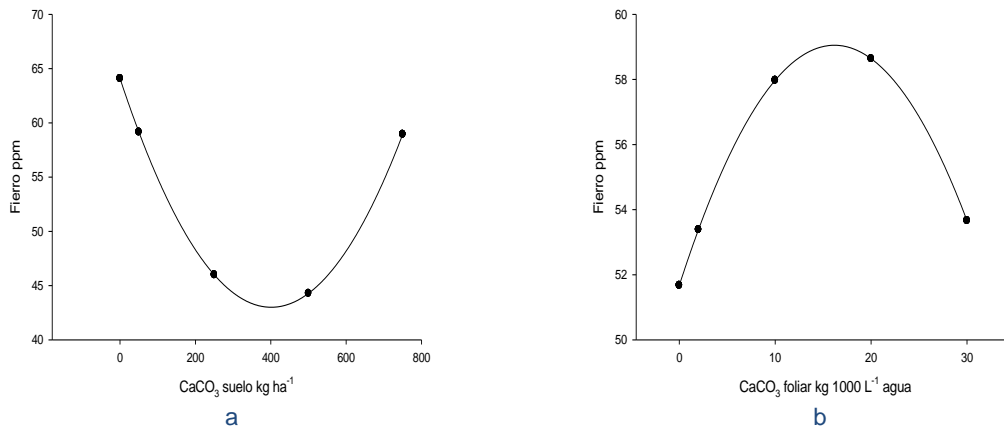


Figura 16 • Efecto complementario de las aplicaciones de carbonato de calcio al suelo (a) y en aspersión foliar (b) sobre el contenido de hierro en la pulpa de fruto de manzana Top Red.

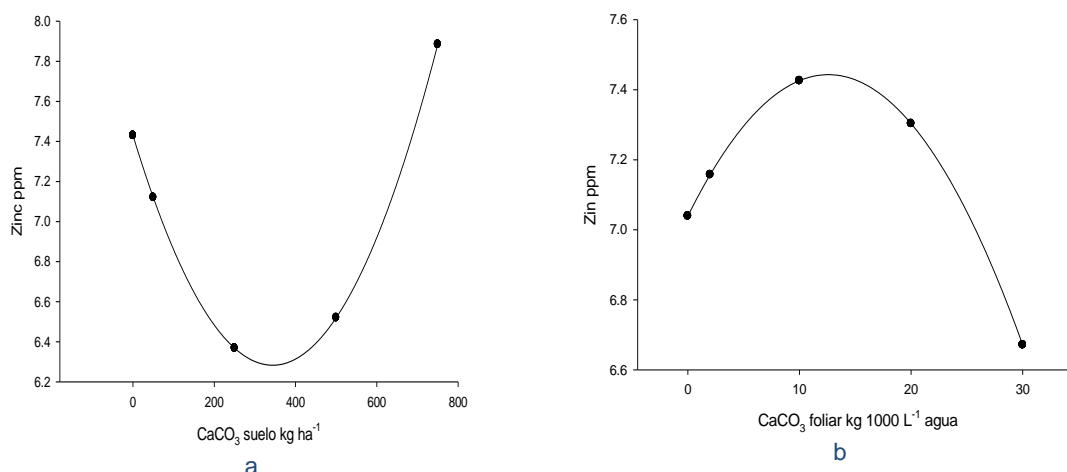


Figura 17 • Efecto complementario de las aplicaciones de carbonato de calcio al suelo (a) y en aspersión foliar (b) sobre el contenido de zinc en la pulpa de fruto de manzana Top Red.

Los resultados obtenidos contradicen la creencia en el sector frutícola de la región de que las aplicaciones de calcio al suelo no son viables para el suplemento de este nutriente y que la opción más efectiva son las aspersiones foliares, ya que se considera que el problema de calcio es de movilidad dentro de la planta y a su vez dentro del fruto y que no obedece a un solo factor sino que son una combinación de mecanismos que disminuyen la concentración de calcio en un tejido específico y localización celular que conducen a los síntomas de deficiencia de calcio (Tonneto y Mitcham (2012) lo cuales se han ido agudizando a través de los años prueba de ello es la presencia cada vez más temprano y con mayor intensidad de la mancha amarga que de ser un problema de postcosecha, ahora se manifiesta desde antes de cosecha, al igual que la pérdida abrupta de la calidad en almacenamiento que se refleja en una menor firmeza y bajo contenido de ácido málico. Aquí se ha demostrado que las aplicaciones de calcio como carbonato de calcio influyen positivamente tanto en firmeza como en contenido de ácido málico, variables estrellas para almacenamiento y vida de anaquel; además, se obtuvieron resultados favorables para mejorar el contenido de nutrientes y no

nada más de calcio en fruto, lo que puede ser utilizado como estrategia de biofortificación, también para potasio, magnesio y además micronutrientes como fierro y zinc.

3.5 CONCLUSIONES

Se mejoró calidad de manzana en cosecha y su conservación en postcosecha para firmeza, acidez titulable y relación azúcar acidez que definen el sabor característico de la variedad y son críticas para almacenamiento. La dosis fue de 400 kg ha⁻¹ de carbonato de calcio al suelo y 10 kg 1000 L⁻¹ en aspersión foliar.

En contenido nutricional foliar el carbonato de calcio incrementó macro y micronutrientes lo que constituyó preámbulo para biofortificación en fruto, los niveles resultantes fueron de 500 kg ha⁻¹ en aplicación la suelo y 15 kg 1000 L⁻¹ agua en aspersión foliar, ésta última se perfiló como complementaria de aquella del suelo.

Se logró biofortificación de fruto con fósforo, potasio, calcio, fierro y zinc, en tanto se realentizó contenido de nitrógeno, magnesio, manganeso y cobre que en su conjunto favorecen la calidad y conservación del fruto, ello fue posible con 400 kg ha⁻¹ de carbonato de calcio en aplicación al suelo en tanto que las aspersiones foliares fueron complementarias e

inclusive de ser necesario para evitar antagonismos con micronutrientes se puede aumentar hasta 700 kg ha⁻¹ en aplicación edáfica.

3.6 BIBLIOGRAFÍA

- Aggelopoulou, K. D., Wulfsohn, D., Fountas, S., Gemtos, T. A., Nanos, G. D., & Blackmore, S.** 2010. Spatial variation in yield and quality in a small apple orchard. *Precision Agric*, 11, 538–556.
- Angón-Galván, P., Santos-Sánchez, N. F., & Hernandez-Carlos, G.** (2006). Índices para la determinación de las condiciones óptimas de maduración de un fruto. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 10(30)
- Bartram D. R.** 1975. 'Golden Delicious' apples for high quality and maximum storage life. Cooperative Extension Service, College of Agriculture, Washington State University. Pullman. E. M. 3496.
- Broadley Martin R., White Philip J.** (2010). Eats roots and leaves. ¿Can edible horticultural crops address dietary calcium, magnesium and potassium deficiencies? *Proceedings of the Nutrition Society*. 69. 601–612 doi:10.1017/S0029665110001588
- Buts, K., Hertog, L., Ho, T., America, H. P., Cordewener, J., Vercammen, J., Nicolai, B.** 2016. Influence of pre-harvest calcium, potassium and triazole application on the proteome of apple at harvest. *J Sci Food Agric*, 96, 4984–4993.
- Buts, K., Hertog, L., Ho, T., America, H. P., Cordewener, J., Vercammen, J., Nicolai, B.** 2016. Influence of pre-harvest calcium, potassium and triazole application on the proteome of apple at harvest. *J Sci Food Agric*, 96, 4984–4993.
- Dilmaghani, M. R., Malakouti, M. J., Neilsen, G. H., & Fallahi, E.** 2004. Interactive Effects of Potassium and Calcium on K/Ca Ratio and Its Consequences on Apple Fruit Quality in Calcareous Soils of Iran. *Journal of Plant Nutrition*, 27, 1149–1162.
- Faust M, Shear CB.** 1980. Nutritional ranges in deciduous fruit tree and nuts. *Horticultural Review*. Edited by Jules Janick, Purdue University. Avi Publishing Co. Inc. Westport. Connecticut. USA. 3 (2):142-163.

- Hammet L. K., Evaluation of fresh market and storage quality of North Carolina apples.** 1980. North Carolina Agricultural Research Service in cooperation with The United States Department of Agriculture. Tech. Bul. No. 262.
- Hermosillo-Cereceres M., Sánchez-Chávez E., Romero L., Ávila-Quezada D., Flores Córdoba M.A., Muñoz Márquez E.** 2015. Biofortificación agronómica con selenio y su efecto en la calidad nutricional de frijol. In *Nutrición. En Nutrición Mineral de las Plantas: Agricultura Sustentable y Protegida*. Editores E. Sánchez Ch., P. Preciado R., L. Romero M., J. L. García H., J. M. Soto P., M. A. Flores Córdoba.
- Hilgsmann Mickael., Neuprez Audrey., Buckinx Fanny., Locquet Médée., Reginster Jean-Yves.** (2017) A scoping review of the public health impact of vitamin D-fortified dairy products for fracture prevention *Arch Osteoporos*. 12: 57 DOI 10.1007/s11657-017-0352-1
- Lu, Y., & Lu, R.** (2016). Quality Evaluation of Apples. In *Computer Vision Technology for Food Quality Evaluation*, Second Edition.
- Mancera-López, M., Soto-Parra, J., Sanchez-Chávez, E., Yáñez-Muñoz, R., MontesDomínguez, F., & Balandrám-Quintana, R.** (2007). Caracterización mineral de manzana "Red Delicious" y "Golden Delicious" de dos países productores. *TECNOCENCIA*, I (2).
- Mengel K, Kirkby EA** 1987. Principles of plant nutrition. 4rd. Ed. Berm Switzerland, International Potash Institute.
- Nava, G., Dechen, A. R., & Nachtigall, G. R.** (2008). Nitrogen and Potassium Fertilization Affect Apple Fruit Quality in Southern Brazil Nitrogen and Potassium Fertilization Affect Apple Fruit Quality in Southern Brazil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 39, 37–41.
- Navruz-Varlı Semr., Köse Süleyman., Tatar Tuğba., Arslan Sabriye., Köksal Eda.** (2018). Assessment of dietary calcium intake of university students: a pilot study in Turkey *Archives of Osteoporosis* 13:36 <https://doi.org/10.1007/s11657-018-0447-3>
- NOM-FF-061-SCFI-2003.** Norma Oficial Mexicana Productos agrícolas no industrializados para consumo humano - fruta fresca- manzana (Malus pumila Mill) – (Malus domestica Borkh) – Especificaciones.
- Roblin Douglas W., Cram Peter, Lou Yiyue., Edmonds Stephanie W, Hall Sylvie F., Jones Michael P., Saag Kenneth G., Wright Nicole C., Wolinsky Fredric D.** (2018). Diet and exercise changes following bone densitometry in the Patient Activation After DXA Result Notification (PAADRN) study. *Archives of Osteoporosis* 13:4 <https://doi.org/10.1007/s11657-017-0402-8>
- Sánchez E. E.** 1999b. Nutrición mineral de frutales de pepita y carozo. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- SAS.** 1989. SAS Institute Inc., SAS/STAT^R User's Guide, Version 6, Fourth Edition, Volume 2, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- SIAP-SIACON-NG-SAGARPA.** 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Sida-Arreola J. P., Sánchez Chávez E., Ávila Quezada G. D., Acosta M. C. H., Zamudio Flores P. B.** 2014. Biofortificación con micronutrientes para el mejoramiento nutricional en cultivos agrícolas. *En Nutrición Mineral de las Plantas: Nuevos Retos en la Producción, Calidad Alimentaria y Sustentabilidad*. Editores E. Sánchez Ch., P. Preciado R., L. Romero M., J. L. García H., J. M. Soto Parra, M. L. García B. ISBN 978-84-89720-21-3. Imprime Plácido Cuadros, Granada, España.
- Soto J. M., Sánchez E., Rodríguez J.C., Yáñez R.M., Montes F., Flores J.B., Piña F.J., Robles L., González A.C.**

2008. Estándares Nutricionales en Flores y Frutos de Manzana (*Malus domestica* Borkh) 'Red Delicious' y 'Golden Delicious'. *En Nueva Relación Entre Agricultura y Nutrición Mineral. Presente y Futuro de la Nutrición Mineral de las Plantas*. Editor-Coordinador L. Romero M. ISBN 978-84-89780-10-7.
- Soto J. M., Sánchez E., Uvalle J.X., Yáñez R.M., Montes F., Ruiz J. M, Romero L.** 2001. Pre-harvest Application Dosages of Aminoethoxyvinylglycine in Relation to Ripening, Fruit Drop and Watercore in 'Red Delicious' and 'Golden Delicious' Apples. *International Journal of Experimental Botany Phyton*. 2001: 171 – 178.
- Soto Parra J. M., Flores Córdova M.A., Piña Ramírez F. J., Sánchez Chávez E., Pérez Leal R., Hernández Valdez F.** 2016. ¿Es el Carbonato de Calcio Alternativa Foliar para Mejorar Calidad de la Manzana? *En Nutrición Mineral de las Plantas, Avances en la nutrición de los cultivos*. Editores: E. Sánchez Ch., P. Preciado R., L. Romero M., J. M. Soto P., J. P. Sida A. ISBN 978-84-89720-23-7. Imprime Plácido Cuadros, Granada, España.
- Soto Parra, JM; Manjarrez Domínguez, CB; Sánchez Chávez E., Piña Ramírez FJ; Flores Plascencia JB; Yáñez Muñoz RM; Basurto Sotelo M; Pérez Leal R.** 2014. Enmiendas, Nutrientes y Reguladores de Crecimiento para Mejorar Calidad de la Manzana. *En Nutrición Mineral de las Plantas. Nuevos Retos en la Producción Alimentaria y Sustentabilidad*. Editores: E. Sánchez Ch., P. Preciado R., L. Romero M., J. L. García H., J. M. Soto P., M. L. García B. ISBN 978-84-89720-21-3. Imprime Plácido Cuadros, Granada, España.
- Tonneto de F. S., Mitcham E.J.** 2012. Factors involved in fruit calcium deficiency disorders. *Horticultural Reviews* Vol. 40. First Edition. Edited by Jules Janick. Ed. Wiley & Sons, Inc.
- Vannucci Letizia., Masi Laura, Gronchi Giorgio, Fossi Caterina, Carossino Anna Maria. Brandi Maria Luisa.** Calcium intake, bone mineral density, and fragility fractures: evidence from an Italian outpatient population. (2017) *Arch Osteoporos* 12: 40 DOI 10.1007/s11657-017-0333-4.
- Vargas H. M., Zarate D. L. G. P., Burguete H., F.** 1991. Factoriales fraccionados y superficie de respuesta, uso de paquetes estadísticos para microcomputadoras. *Monografías y Manuales de Estadística y Cómputo*. Vol.10 No. 1.
- White PJ & Broadley MR** (2003) Calcium in plants. *Ann Bot* 92, 487–511.
- Wojcik P.** 2002. Yield and 'Jonagold' Apple fruit quality as influenced by spring sprays with commercial rosatop material containing calcium and boron. *Journal of Plant Nutrition*. 25(5):999-1010.

Biofortificación agronómica como clave para la fortificación con micronutrientes en leguminosas

4

Sánchez Chávez, Esteban; Romero Monreal, Luis; Muñoz Márquez, Ezequiel; Sida Arreola, Juan Pedro.

4.1 Introducción	65
4.2 Formas de fertilizar	65
4.3 Métodos de aplicación	73
4.4 Otras prácticas agrícolas que afectan la concentración de micronutrientes en los cultivos	78
4.5 Obstáculos y desventajas	81
4.6 Perspectivas y desafíos	81
4.7 Conclusiones	81
4.8 Bibliografía	82

4

Biofortificación agronómica como clave para la fortificación con micronutrientes en leguminosas

Sánchez Chávez, Esteban; Romero Monreal, Luis; Muñoz Márquez, Ezequiel; Sida Arreola, Juan Pedro.

4.1 INTRODUCCIÓN

Los diferentes enfoques agronómicos para mejorar los niveles de los micronutrientes en los cultivos han demostrado ser efectivos (Lyons *et al.*, 2004), el manejo del suelo y la fertilización si contribuyen de manera significativa a la mejora de la calidad de los frutos (Nestel *et al.*, 2006, Sida-Arreola *et al.*, 2017). Esta última practica incluye la aplicación de fertilizantes minerales y/o abonos orgánicos al suelo para elevar el suministro de nutrientes disponibles para el cultivo que se encuentra en desarrollo (Hoseinzade *et al.*, 2015), incrementando sus funciones morfológicas, fisiológicas y metabólicas que permiten la expresión de su potencial genético (Anchal Dass *et al.*, 2017).

Estos métodos se desarrollan con el fin de combatir la desnutrición mineral en las personas, como un desafío global serio de la humanidad. La desnutrición mineral se puede afrontar a través del enriquecimiento de alimentos, la diversificación de la dieta, la biofortificación y la suplementación mineral. Sin embargo, estas estrategias no siempre han tenido éxito, pero entre ellas, la biofortificación ha demostrado que la aplicación de fertilizantes es la mejor manera de adquirir elementos minerales de manera inmediata (Pfeiffer & McClafferty, 2007). Además, los elementos de los cultivos biofortificados deben estar biodisponibles para los humanos, por eso se recomienda elevar las concentraciones de las sustancias “promotoras” como el ascorbato (vitamina C), β -caroteno, polipéptidos ricos en cisteína y aminoácidos, que estimulan la absorción de elementos minerales esenciales por el intestino, y reducen las concentraciones de antinutrientes, como el oxalato, polifenoles (taninos) o fitato, que interfieren con su absorción (Philip y Martin, 2009).

Un cultivo que logra cubrir las necesidades de alimentación de la población, básico en la dieta diaria de la mayoría de la población mundial y fácilmente manejable para los programas de biofortificación es el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), es la leguminosa de grano más importantes para consumo humano en el mundo. México ocupa el quinto lugar en la producción mundial y tercero en América, y se estima un consumo promedio nacional de 10.38 kg por persona por año (SIAP, 2018). México es también centro de origen y diversificación de *Phaseolus vulgaris* (Bitocchi *et al.*, 2012), la variación de formas, tamaños y colores de semilla presentes en las diversas regiones donde se cultiva, es una muestra de la diversidad genética del frijol común cultivado en campos mexicanos (Vargas-Vázquez *et al.*, 2008). Esta importante leguminosa aporta una cantidad sustancial de proteínas, carbohidratos, vitaminas, fibra, metabolitos secundarios con alta actividad antioxidante y minerales (Guzmán *et al.*, 2002). La ingesta de macro y microelementos minerales está asociada con la prevención de diversas enfermedades (Bidoli *et al.*, 2005) y enfermedades crónico-degenerativas que incluyen algunos tipos de cáncer (Suárez-Martínez *et al.* 2016).

En este contexto, se vuelve una necesidad implementar los programas de biofortificación en leguminosas, como cultivos de primera necesidad alimentaria para las poblaciones urbanas y en especial las rurales que dependen de ellas para su alimentación diaria.

4.2 FORMAS DE FERTILIZAR

La absorción y asimilación de nutrientes depende no solo un sistema radicular vigoroso que explora una mayor superficie de suelo, sino también, de la suficiencia de nutrientes disponibles en él. La disponibilidad de nutrientes está en función del suministro de estos en el suelo y de la actividad

microbiana en la rizósfera (Römheld y Neumann 2006, Turner *et al.*, 2013). La humedad del suelo también influye en la disponibilidad y captación de nutrientes (Hazra y Chandra 2014), afectando sus procesos de mineralización y solubilización, que además, está estrechamente ligado a la composición y magnitud de la microbiota existente. Algunos microorganismos se involucran estrechamente con las plantas para facilitar el abastecimiento de agua y nutrientes minerales; los diazotófos aerobios fijan el nitrógeno atmosférico en amonio, que es una forma más disponible para las plantas, y otras bacterias que son solubilizantes del fósforo (Buscot y Varma 2005), por citar solo unos ejemplos.

La manera más fácil que aumenta la concentración de los nutrientes en el medio donde se desarrollan las plantas, es la fertilización en sus diferentes modalidades, con estos métodos se logra incrementar la concentración de los diferentes elementos en la parte comestible (Almendros *et al.*, 2015) mejorando su calidad nutracéutica.

Para llevar a cabo una buena biofortificación agronómica, se deben tener muy en cuenta las características del suelo o sustratos donde se esté desarrollando el cultivo, además de las diferentes fuentes de nutrientes que se emplearán, ya que tienen gran influencia en la biofortificación de las plantas. Es muy conocido que los suelos difieren en su composición mineral y que la fitodisponibilidad de los nutrimentos depende de diferentes factores (Pinto y Ferreira, 2015), la capacidad de retención de agua, la capacidad de intercambio catiónico del suelo, el pH y la capacidad de intercambio catiónico (Saeid y Jastrzębska 2018).

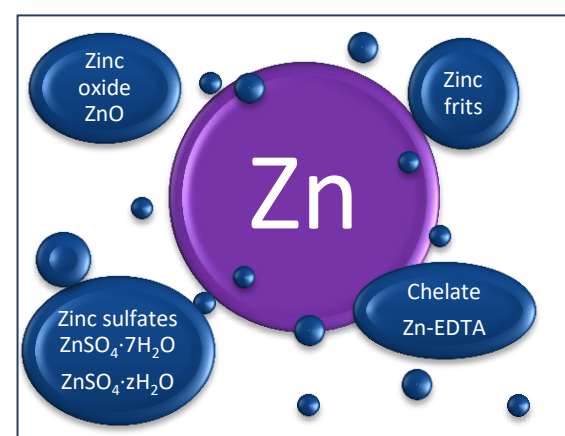
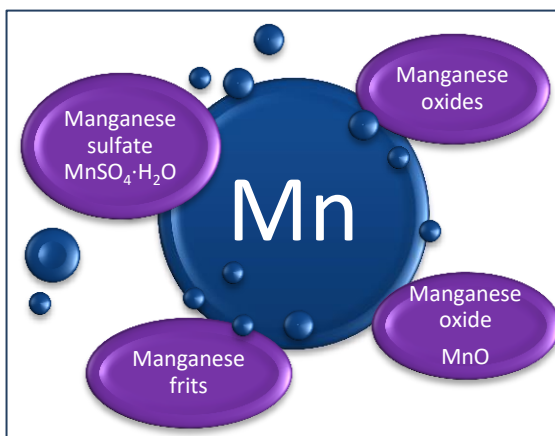
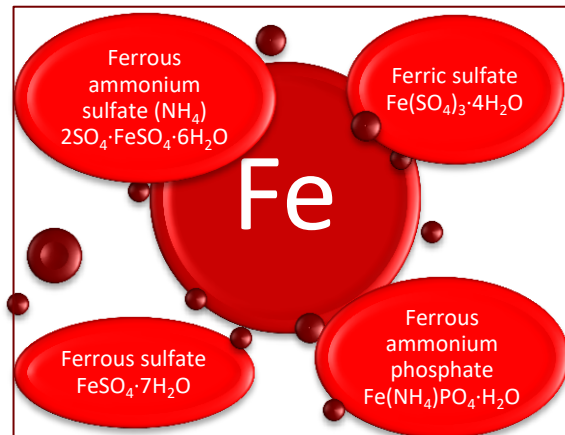
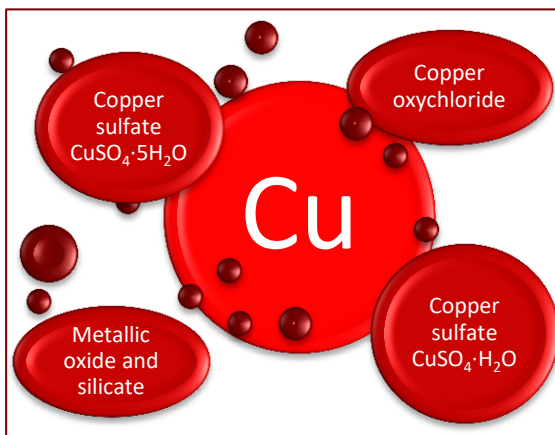
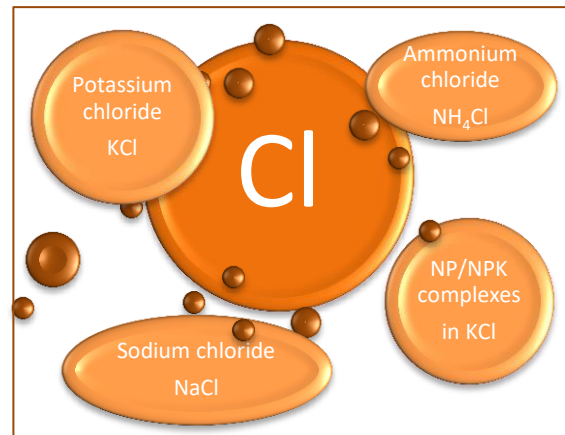
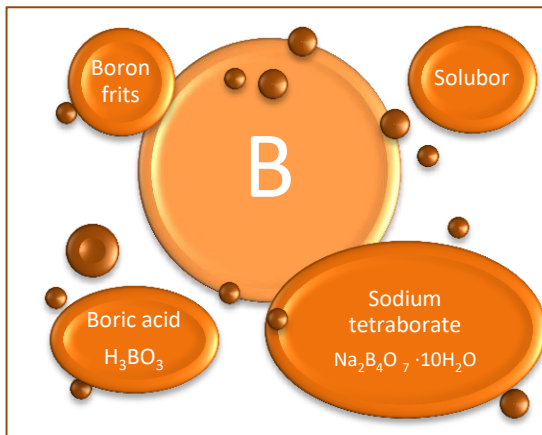
La forma en la que se aplican los macronutrientes define la biodisponibilidad de los micronutrientes, y como la interacción entre

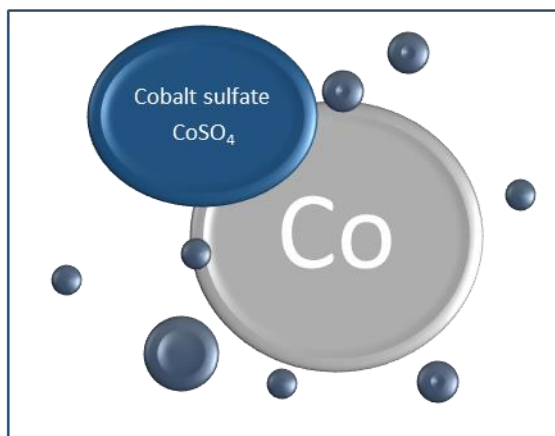
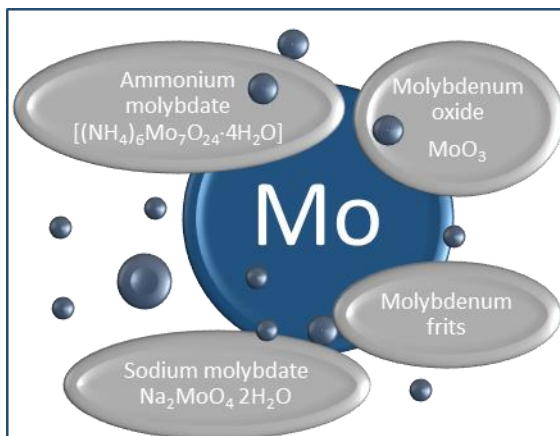
éstos puede actuar positiva o negativamente en su eficiencia y rendimiento (Saha *et al.*, 2015; Rietra *et al.*, 2015). Al aplicar los nutrientes a los cultivos se espera que aumente su contenido en los tejidos vegetales, sin embargo este aumento depende del tipo de fertilizantes aplicados (Dai *et al.*, 2009). Hoy en día se pueden aplicar diferentes materiales como fuentes de nutrimentos para los cultivos; desechos industriales y agroalimentarios, fertilizantes sintéticos, productos reciclados y biofertilizantes microbianos. Los quelatos, sales minerales y biofertilizantes son los grupos principales de nutrientes que son aplicados a las plantas.

4.2.1 Fertilizantes inorgánicos

Diversas investigaciones han demostrado que los micronutrientes en ocasiones se convierten en factores limitantes para los fertilizantes N-P-K, por tal motivo, al programar la fertilización basada en estos macronutrientes se debe complementar con los micronutrientes deficientes. La aplicación de microelementos en forma de sales inorgánicas es la forma más común dentro de la biofortificación agronómica, ya que traen consigo muy buenos resultados al suplementar micronutrimentos específicos (Saeid y Jastrzębska 2018). Los sulfatos son los más probados y generalmente los sulfatos de Zn y Fe, cuyos elementos presentan los principales problemas de deficiencia en la población mundial (Rosado *et al.*, 2009), entre otros como: Se, I, Cu, Ca y Mg (Zhao y McGrath, 2009).

Hoy en día la forma inorgánica de los nutrientes que se utiliza como complemento en los fertilizantes a base de N-P-K se muestran en los siguientes esquemas:





Fuente: Jones, J. B., Plant Nutrition Manual, Boca Raton, CRC Press, 1997; Roy, R. N. *et al.*, In: Sources of Plant Nutrients and Soil Amendments. Fertilizer and Plant Nutrition Biuletin, Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006.

Una práctica adicional que mejora la efectividad de los fertilizantes inorgánicos aplicados al suelo es la aplicación simultánea de microelementos al follaje. Estudios han demostrado que al aplicar Zn en una dosis de 25.0 Kg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ /ha y 2 aplicaciones foliares de 0.5% de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ pudieron mejorar la concentración de Zn en chícharo (Saha *et al.*, 2015, Poblaciones y Rengel, 2016). Sida-Arreola *et al.*, 2017 publicaron que al aplicar DTPA-Zn y $ZnSO_4$ al suelo en cultivo de frijol cv. Strike se indujo la acumulación de Zn en las semillas, y que una dosis de 25 μM de DTPA-Zn aumenta significativamente las concentraciones de este elemento en la semilla de frijol.

Otros estudios sobre biofortificación en frijol con fertilizantes inorgánicos, mostraron como una dosis de 25 μmol de Fe-EDDHA aumentó significativamente la concentración de Fe en semillas de la variedad Strike, además de elevar el rendimiento de este cultivar. Además, se indicó que el efecto de Fe en este sistema depende en gran medida de la forma en que se aplica este elemento traza. En las semillas de frijol, la aplicación de $FeSO_4$ produjo un mayor aumento en la actividad de las enzimas

antioxidantes que la forma de Fe-EDDHA en las dosis estudiadas (Sida-Arreola *et al.*, 2015).

4.2.2 Fertilizantes orgánicos

Actualmente, estos fertilizantes son empleados para mejorar las condiciones del suelo adicionando grandes cantidades de materia orgánica (Kizos *et al.*, 2010), y para la producción de cultivos orgánicos libres de fertilización química. Comúnmente son estiércol de ganado, material vegetal, abonos verdes, compost, turba, algas marinas, guano, etc (Hazra, 2016). Otros materiales que se han utilizado como fertilizantes son los lodos biosólidos derivados de las plantas tratadoras de aguas residuales; toda clase de desechos de la industria alimentaria y producción de frutas y hortalizas, ganadera, forestal, cervecera, industria del papel, entre otras (Saeid y Jastrzębska 2018).

Estos materiales son una fuente importante de macro y micronutrientes, muchos de los micronutrientes se encuentran fuertemente ligados en compuestos orgánicos complejos que generalmente no están fácilmente disponibles para las plantas (Das, 2016), pero a medida que la materia orgánica se va degradando, este tipo de compuestos son liberados y quedan disponibles para que sean tomados por las raíces

(Hazra, 2016). Los micronutrientes se encuentran presentes en pequeñas cantidades en los fertilizantes orgánico, sin embargo éstos acondicionan los suelos para mejorar las propiedades químicas, físicas y microbiológicas que propician la disponibilidad de los micronutrientes (El Sayed Hameda *et al.*, 2012). El inconveniente potencial que tienen los fertilizantes orgánicos, es que el periodo de liberación de los nutrientes es muy largo y en bajas concentraciones, y no es suficiente para darle a la planta lo que necesita para su desarrollo, además dependen de los microorganismos del suelo para la mineralización y estos a su vez dependen de la humedad y temperatura del suelo para que estén activos (Jones y Jacobsen, 2009).

Ya que los materiales orgánicos presentan cantidades pequeñas de micronutrientes, es común que se presenten fluctuaciones. Algunos ejemplos de esto lo podemos observar en diversas investigaciones realizadas por diferentes autores como se muestran a continuación:

Biocomposta (mg/ L): Fe= 7005, Cu= 202, Zn= 941.

Vermicomposta (mg/ L): Fe= 27.44, Cu= 3.28, Zn= 25.04 (Márquez-Hernández, 2006).

Extracto de estiércol bovino (mg/ L): Fe= 30, Cu= 0.31, Mn= 8.9, Zn= 7.6, B=2.7. Extracto de estiércol bovino acidulado (mg/ L, acidulado con H₂SO₄): Fe= 42, Cu= 0.42, Mn= 6.9, Zn= 6.7, B=2.8.

Extracto de estiércol bovino estabilizado (mg/ L, Estabilizado con calor hasta ebullición para estabilizar la actividad microbiológica): Fe= 27, Mn= 7.3, Zn= 6.0, B=3.4.

Té de compost (mg/ L): Fe= 0.409, Cu= 0.13, Mn= 0.089, Zn= 0.19 (Preciado-Rangel *et al.*, 2010).

Harina de jaiba (mg/L): Fe= 0.051, Cu= 0.0115, Mn= 0.029, Zn= 0.0103, B= 0.0018 (Beltrán-Morales *et al.*, 2015).

En experimentos realizados en Turquía, las aplicaciones de estiércol provocaron un aumento del contenido de Cu en el grano de frijol, pero alterando las concentraciones de Fe, Mn y Zn (Uyanöz, 2007).

Numerosos estudios han recomendado el uso de fertilizantes orgánicos como una herramienta de biofortificación de micronutrientes en cultivos, El-Ghamry *et al.*, 2009 aplicaron estiércol al cultivo de trigo y se tuvo un aumento significativo en la concentración de Fe, Mn y Zn en el grano. En otros estudios, las concentraciones de Fe y Zn aumentaron a través de la aplicación de vermicompost en los granos de cultivos de cebada en Irán (Farahani *et al.*, 2011).

También se ha demostrado que con la aplicación de abonos verdes como son las algas, se puede incrementar la acumulación de Yodo en los cultivos, ya que éstas son ricas en este elemento (Lawson *et al.*, 2015).

Como se mencionó anteriormente es de vital importancia no solo la concentración de los microelementos en el suelo, sino también su biodisponibilidad para que puedan ser tomados por las plantas (Gondek *et al.*, 2013). Estudios realizados por Rutkowska *et al.*, 2014 mostraron la influencia a largo plazo que tiene la materia orgánica sobre los microelementos disponibles en el suelo y la solución del suelo, ya que al aumentar la materia orgánica en el suelo, la movilidad del Fe, Cu y Mn disminuye en la solución del suelo.

Debe tenerse en cuenta que los micronutrientes tienen diferentes propiedades y comportamientos químicos específicos. El Zn es un metal disponible en el suelo (Kabata-Pendias, 2010), la adición en fertilizantes orgánicos generalmente aumenta su concentración en los cultivos (Hamnér y Kirchman, 2015). El Cu está fuertemente ligado a la materia orgánica (Hwang *et al.*, 2015). Incluso cuando la materia orgánica se descompone y se libera Cu, todavía hay una gran cantidad de sitios de enlace disponibles para que el Cu se vuelva a enlazar. Por lo tanto, la adición de fertilizantes orgánicos no afecta significativamente concentraciones de Cu en cultivos (Hamnér y Kirchman, 2015). El Mn es abundante en los suelos y su disponibilidad está principalmente controlada por el pH del suelo y las condiciones redox, por lo tanto, la fertilización con enmiendas orgánicas no altera significativamente la absorción de los cultivos a menos que el pH y la redox se vean afectados (Hamnér y Kirchman, 2015). La disponibilidad de Mo también se ve afectada principalmente por el pH en el suelo (Gupta y Lipsett, 1981) y la cantidad de Mo adicionado al aplicar un fertilizante orgánico es muy pequeña, incluso el fertilizante orgánico puede no tener ningún efecto a menos que el pH del suelo sea favorable (Hamnér y Kirchman, 2015).

La aplicación de yodo al suelo junto con sustancias húmicas o ácidos orgánicos muestra efectos positivos sobre la absorción de I por las plantas (Smoleń *et al.*, 2016). En los fertilizantes orgánicos el Se está presente en formas orgánicas, al descomponerse la materia orgánica el selenio se mineraliza en selenita y selenato (Borowska y Koper, 2006). Estudios han demostrado que el Se mineralizado a partir de enmiendas orgánicas puede ser suficiente para influir en el contenido de este elemento en los cultivos (Hamnér y Kirchman, 2015).

La absorción de elementos por las raíces está controlada por la concentración de otros elementos y su interacción positiva o negativa entre ellos (Efremova y Izosimova, 2014). Lo anterior debe tomarse en cuenta al utilizar algún fertilizante orgánico de la naturaleza de los lodos residuales, que con frecuencia contienen algunos metales que tienen sinergismo con otros elementos y afectan la absorción de micronutrientes en los cultivos (Hamnér y Kirchman, 2015). Un ejemplo de lo anterior es que la acumulación de Fe, Mn, Cu y Zn liberados de una fuente orgánica, fue promovida por la aplicación de nitrógeno en granos de arroz (Naeem *et al.*, 2012).

Con la publicación de diversos estudios, la aplicación combinada de fertilizantes minerales parece una buena técnica para la biofortificación con micronutrientes de la parte comestible de diferentes cultivos. Todo lo mencionado aplica al uso de materiales orgánicos con fertilizantes N-P-K con preparación para microelementos. Un aumento considerable en la concentración de Zn, Mn, Cu y Fe se obtuvo con la aplicación de estiércol con fertilizantes minerales a base de nitrógeno en el cultivo de maíz (Ashmaye *et al.*, 2008), en espinacas (Shaban *et al.*, 2008) y en producción de arroz (Shaban *et al.*, 2009).

Diferentes estudios en cultivo de trigo mostraron que aplicando estiércol y micronutrientes foliares, había un cambio significativo en la concentración de B, Mo y Zn en granos de trigo (El-Ghamry *et al.*, 2009). También, con la aplicación de paja de arroz composteada y ZnSO₄ inorgánico, se pudo aumentar la concentración de Fe, Mn y Zn en grano de arroz y de esta manera elevar su calidad nutracéutica (Naeem *et al.*, 2012).

Recientemente, la demanda de productos orgánicos se ha incrementado a nivel mundial porque se tienen la creencia que los alimentos producidos con fertilizantes naturales son más

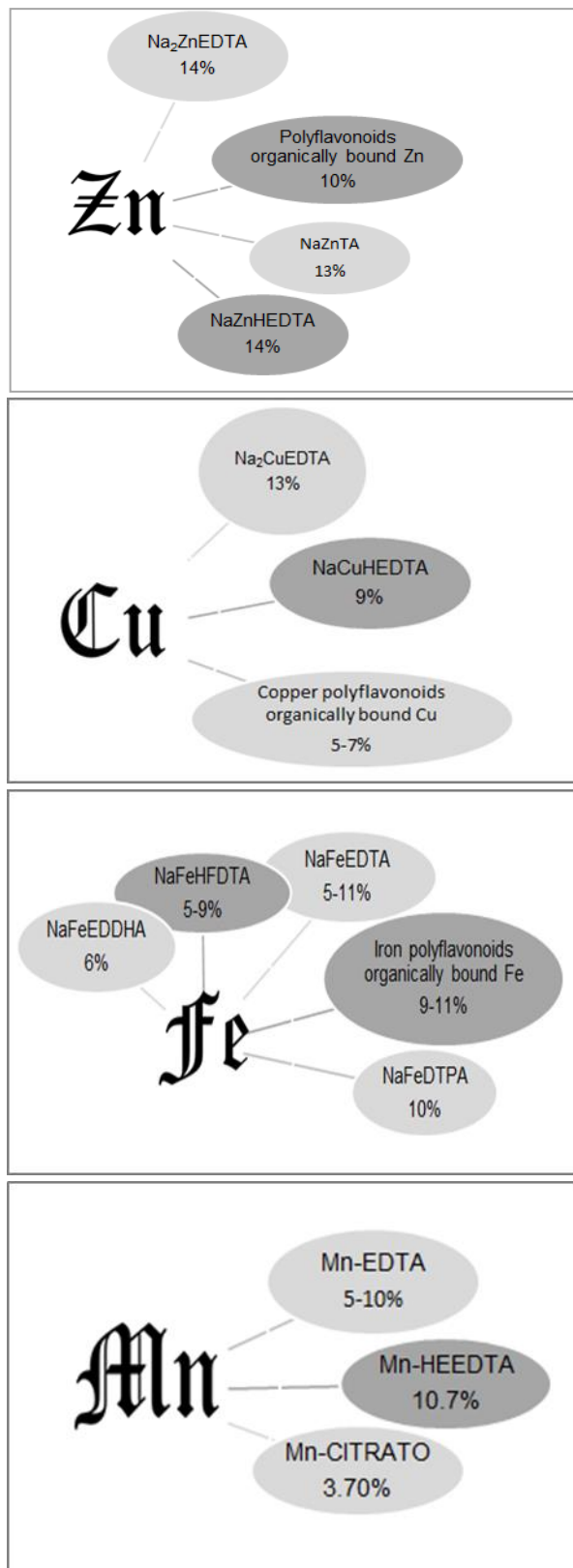
nutritivos que los cultivados convencionalmente, y que tienen mejor equilibrio de vitaminas y minerales. Sin embargo, la comunidad científica no ha demostrado de manera concluyente que los productos orgánicos son más nutritivos que los producidos de manera convencional (Winter y Davis, 2006). Por lo anterior, son necesarias mayores investigaciones para mejorar la concentración de microelementos esenciales en alimentos por fertilizantes orgánicos y también prevenir la acumulación de contaminantes tóxicos.

4.2.3 Quelatos

Se demostró que la aplicación de complejos de quelatos metálicos promueve en gran medida la captación de iones metálicos en las raíces de las plantas (Degryse *et al.*, 2012). Unos de los casos más documentados son el del Fe y el Zn; donde se ha demostrado que su aplicación en formas quelatadas aumenta su concentración en la parte comestible de las plantas, a diferencia de las sales minerales (Roy *et al.*, 2006).

Diversas investigaciones han demostrado que la aplicación de Fe-EDDHA influye en la concentración de Fe en el fruto de las plantas (Liu *et al.*, 2015) y en semilla de frijol ejotero (Sida-Arreola *et al.*, 2015). Así mismo, la aplicación de quelatos de Zn, también tiene efectos favorables en la acumulación de este micronutriente en el fruto de las plantas. Sida-Arreola *et al.*, 2017 aplicaron Zn-DTPA para comprobar su efecto en la biofortificación de frijol ejotero, obteniendo excelentes resultados.

A continuación se muestran las formas quelatadas de micronutrientes más utilizadas en la fertilización agronómica:



Fuente: Jones, J. B., Plant Nutrition Manual, Boca Raton, CRC Press, 1997; Roy, R. N. *et al.*, In: Sources of Plant Nutrients and Soil Amendments. Fertilizer and Plant Nutrition Buletin, Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006.

4.2.4 Biofertilizantes

En el suelo la actividad de las diferentes especies de microorganismos bacterianos y fúngicos descomponen la materia orgánica y dejan disponibles los nutrientes para que sean absorbidos por las plantas, esta absorción se da de manera directa a través de las mismas raíces o indirecta a través de los microorganismos que forman simbiosis con ellas (Martínez y Pugnaire, 2009).

Las plantas a través de los exudados radiculares son las fuentes primarias de energía para las redes tróficas edáficas. Los microorganismos tienen efectos específicos para la descomposición y ciclos de los nutrientes (Batten *et al.*, 2008). La biota edáfica en sus procesos ecosistémicos fundamentales es responsable de la descomposición y mineralización de la materia orgánica y de los ciclos biogeoquímicos (Rodríguez *et al.*, 2009). Algunos de los microorganismos que participan en estos procesos y que comúnmente se emplean para la elaboración de biofertilizantes son los hongos micorrizicos, que son bien conocidos por aportar numerosos beneficios para las plantas tales como el incremento en la absorción de nutrientes del suelo y su influencia sobre las relaciones hídricas (Aguilera *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta lo anterior descrito, un biofertilizante se define como una sustancia que contiene microorganismos vivos y que ayuda con la expansión del sistema radicular y la mejora en la germinación de las semillas. Los biofertilizantes difieren de los fertilizantes químicos y orgánicos en el sentido de que no suministran directamente los nutrientes para las plantas ya que son cultivos de bacterias y hongos especiales. La tecnología para su producción es relativamente simple y el costo de instalación es muy bajo en comparación con las plantas de fertilizantes químicos (Chen, 2006). Los principales microorganismos empleados para la elaboración de biofertilizantes son:

4.2.3.1 Risobios

Son bacterias simbióticas que colonizan la raíz de las plantas, forman nódulos y fijan el N₂ atmosférico en una relación de beneficio mutuo, suministran minerales esenciales que la planta sintetiza y éstas a su vez, proporcionan a las bacterias las sustancias necesarias para su subsistencia.

Este tipo de simbiosis es característico de las leguminosas, que gracias a su capacidad de fijación de nitrógeno dependen en menor cantidad del fertilizante nitrogenado inorgánico. En el cultivo de las leguminosas la inoculación de *Risobium* es una práctica agronómica empleada frecuentemente para suministrar N al cultivo, se ha reportado que estas bacterias pueden fijar de 50 a 300 Kg de N/ha. A mayor aplicación del inoculo en el suelo durante la siembra mayor probabilidad de colonización y de asegurar la modulación.

4.2.3.2 Azotobacter y Azospirillum

Son bacterias de vida libre que fijan el nitrógeno atmosférico en los cultivos de cereales sin ninguna simbiosis y no necesita una planta anfitriona específica. Los *Azotobacter* son abundantes en suelos neutros y bien drenados. Pueden fijar de 15 a 20 Kg/ha N por año. *Azotobacter* sp. también puede producir compuestos antifúngicos que son empleados para combatir patógenos. Tienen la capacidad de aumentar la germinación y el vigor en las plantas jóvenes.

4.2.3.3 Bacterias solubilizadoras de fosfato

En condiciones de suelos ácidos o calcáreos, se fijan grandes cantidades de fósforo en el suelo, pero no se encuentra disponible para las plantas. Las fosfobacterinas facilitan que el fósforo insoluble quede disponible para las plantas. El efecto de solubilización de las fosfobacterinas se debe a la producción de ácidos orgánicos que

reducen el pH del suelo y provocan la disolución de las formas fijas de fosfato (Chen, 2006).

4.2.3.4 Micorrizas arbusculares

Son hongos que tienen una relación simbiótica benéfica con las raíces de las plantas. Estos hongos infectan y se propagan dentro de la raíz, poseen estructuras especiales conocidas como vesículas y arbusculos que se desarrollan dentro de las células corticales. Una vez realizada la simbiosis, las plantas translocan sustancias a los hongos para que estos puedan alimentarse, y a su vez, los hongos suministran nutrientes y agua a las raíces de las plantas. Las hifas fúngicas se pueden extender 100 veces la longitud de la raíz, alcanzan áreas de suelo más húmedas y ayudan a las plantas para que puedan absorber una gran cantidad de nutrientes, particularmente minerales disponibles como fósforo, zinc, molibdeno y cobre. Las micorrizas aumentan la tolerancia de las plántulas al estrés hídrico y las altas temperaturas, a infección por hongos patógenos e incluso a la acidez extrema del suelo.

4.2.3.5 Rizobacterias promotoras del crecimiento

Influyen en la fijación de N₂ y aumentan la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera, influyendo positivamente en el crecimiento y la morfología de la raíz y promoviendo otras plantas beneficiosas simbiosis microbiana. Ratti *et al.*, 2001, encontraron que una combinación de hongos micorrízicos arbusculares como *Glomus aggregatum*, las rizobacterias *Bacillus polymyxa* y *Azospirillum brasilense* maximizaron la biomasa y el contenido de P en plantas aromáticas palmarosa (*Cymbopogon martinii*) cuando se cultivaron con un fosfato inorgánico insoluble.

Cuando la actividad microbiológica está en equilibrio, y se favorecen las poblaciones de bacterias y hongos a nivel rizosférico, se

favorece la movilidad de minerales como el hierro hacia la planta y facilita el proceso de acumulación en semillas (Garau *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2015).

4.3 MÉTODOS DE APLICACIÓN

Para obtener los resultados que se desean al implementar un programa de biofortificación, no solo debe de tenerse en cuenta la fuente de nutrientes que será empleada, sino también el método de aplicación de éstos (Mao *et al.*, 2014; Melash *et al.*, 2016; de Valença *et al.*, 2017). Las técnicas de aplicación son directamente al suelo, aspersiones foliares, fertigación y por medio de tratamientos directamente aplicados a las semillas (Farooq *et al.*, 2012; Singh y Prasad, 2014; Smoleń *et al.*, 2016).

Debido a que cada elemento es diferente a los otros, se debe tomar muy en cuenta la particularidad individual de cada nutriente para poder aplicarlos (Pankaj *et al.*, 2016). En estudios realizados se ha visto que el Fe y Mn se aplican mejor por vía foliar (Narwal *et al.*, 2012), aunque estudios realizados por Sida-Arreola *et al.*, 2015 demostraron que por vía edáfica se logró un aumento considerable en la concentración de Fe en semillas de frijol. El Mo y el Ni no se absorben a través de las hojas por lo que la aplicación edáfica es el mejor método. Otros microelementos como Zn, Cu, B, y Cl se pueden aplicar con ambas técnicas (Dimpka y Bindraban, 2015), Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo también se pueden suministrar a través de fertigación (Pagani *et al.*, 2013).

Los micronutrientes pueden ser aplicados por medio de un producto granular o disueltos en fertilizantes líquidos o el agua de riego. Los quelatos han demostrado mayor estabilidad y tienen muy buenos resultados en programas de biofortificación, los fertilizantes óxidos rápidamente se convierten en formulas disponibles al ser aplicados al suelo. Debido a

que algunos micronutrientes pueden fácilmente ocasionar toxicidad en la planta como es el caso del boro, se debe de considerar cuidadosamente la tasa de aplicación, ubicación y fuente del fertilizante (Pagani *et al.*, 2013).

4.3.1 Inoculación de biofertilizantes

Los biofertilizantes generalmente se aplican al suelo, las semillas o las plántulas, con o sin algún vehículo para los microorganismos, por ejemplo, turba, compost, etc. La formulación de inóculos, el método de aplicación y el almacenamiento del producto son puntos críticos que se deben de tomar muy en cuenta para el éxito de un producto biológico; su corta vida útil y susceptibilidad a las altas temperaturas, son problemas que deben ser resueltos para obtener una inoculación efectiva.

Inoculación de semillas

Las bacterias *Rhizobium* han demostrado ser efectivas como inoculantes de semillas para leguminosas, el tratamiento de éstas puede realizarse con dos o más bacterias sin efecto antagónico. Primeramente las semillas deben ser cubiertas con *Rhizobium*, *Azotobacter* o *Azospirillum*, cuando cada semilla tiene una capa de las bacterias antes mencionadas, sólo entonces se usa el inóculo de Rizobacterias promotoras del crecimiento. Este método proporcionará cantidades máximas de cada bacteria para generar mejores resultados.

Inoculación al suelo

Las cepas de los microorganismos cultivados se aplican directamente en el suelo o por medio del agua de riego. Los microorganismos benéficos entonces deben de competir con la microbiota ya existente, sin embargo tienen un potencial considerable para controlar el equilibrio microbiológico del suelo y proporcionar un entorno más favorable para el crecimiento y protección de las plantas.

4.3.2 Fertigación

Empleando esta técnica, se asegura un porcentaje muy alto de disponibilidad y absorción de los nutrientes, ya que se suministran directamente a la zona radicular activa (Kabir *et al.*, 2016). Los principales factores que se consideran al elegir un producto de micronutrientes para ser aplicados por este método, son la solubilidad y la compatibilidad. Si se quiere implementar un programa de biofortificación con Fe, se recomienda que se aplique en sus formas quelatadas como el caso de FeEDDHA ya que tiene mayor estabilidad que el FeEDTA por encima de un pH de 6.5. Las formas quelatadas de Fe, Zn, Mn y Cu son recomendadas para mantener la solubilidad, minimizar la precipitación y lograr una distribución homogénea (Bell y Dell, 2008).

Existen diversas investigaciones que hablan del éxito de la biofortificación empleando la fertirrigación; aunque la mayoría se ha hecho en algunas hortalizas y cereales, pueden aplicarse al cultivo de leguminosas. Un caso muy exitoso de biofortificación agronómica por fertirrigación fue la realizada en una provincia de China, donde se aplicó KIO_3 incrementando de manera significativa el contenido de yodo en la parte comestible de los cultivos mediante el agua de riego. Este programa permitió bajar la tasa de mortalidad de niños en Xinjiang en un 50% (Cao *et al.*, 1994, Jiang *et al.*, 1997).

Experimentos realizados mostraron un aumento en la concentración de Zn en grano de 45% y hasta 85% en tratamientos donde se aplicó también nitrógeno (Alam *et al.*, 2000). En cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) empleando fertigación, se demostró el aumento del contenido de Mn al incrementar la dosis de este microelemento en la solución nutritiva aplicada (Kleibert, 2014). La adición de yodo por fertigación logró aumentar la concentración de este elemento en espinacas (Dai *et al.*, 2006), convirtiéndolo en un método rentable y eficaz

para el suministro de I en hortalizas (Ujowundu *et al.*, 2010).

En experimentos donde se evaluó la biofortificación con Se en condiciones de déficit de agua, empleando fertirrigación y condiciones normales de cultivo, la fertirrigación fue más efectiva y viable para aumentar la translocación de este microelemento hacia las partes comestibles de las plantas (Nawaz *et al.*, 2014, 2015, 2016).

En estudios donde se evaluó la absorción de micronutrientes mediante las técnicas de fertirrigación y la fertilización pre siembra, los autores afirman que la fertirrigación resultó más eficaz en la biofortificación de yodo en un 339% y 498% más empleando las fuentes fertilizantes de KI y KIO₃ respectivamente. Con estos estudios se puede concluir que se pueden reducir los costos de los programas de biofortificación empleando concentraciones más bajas de los nutrientes (Smoleń y Sady, (2012), Smoleń *et al.* (2016)). Hermosillo-Cereceres *et al.*, 2011 evaluaron diferentes dosis (0 a 160 µM) y formas (Na₂SeO₃ y Na₂SeO₄) de Se aplicados en solución nutritiva en cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L., cv. Strike), donde encontraron que los tratamientos con selenito tuvieron mayor acumulación de Se en las semillas en comparación con el selenato. Además, sus resultados muestran que concentraciones altas de Se (160 µM) inhiben la asimilación de Zn, Cu, Fe y Mn; por lo que es importante analizar la concentración de Se que será aplicada en los potenciales programas de biofortificación.

Son poco los estudios realizados en frijol referente a la fertirrigación aplicada con fines de biofortificación. La mayoría de los trabajos se enfocan al ahorro del agua y al uso eficiente de los fertilizantes NPK.

4.3.3 Foliar

La fertilización foliar con micronutrientes frecuentemente es más efectiva que la aplicación al suelo y permite mayor asimilación de nutrientes hacia la parte comestible de las plantas (Lawson *et al.*, 2015; de Valença *et al.*, 2017). Sin embargo se deben de tomar muy en cuenta las desventajas que conlleva la aplicación de nutrimentos mediante este método; una de las más importantes es la quema de hojas al aplicar una concentración excesiva de nutrientes, lo cual provoca toxicidad en la planta (Mortvedt, 1985).

Los estudios sobre la concentración de microelementos empleando aplicaciones foliares, no muestran la concentración de estos elementos en la parte comestible, por lo que la información disponible es limitada. Uno de los elementos que se ha estudiado al ser aplicado por este método y ser medido en la parte comestible de las plantas es el Zn. Las posibilidades de biofortificación de cultivos con Zn aplicado vía foliar ha sido descrita por varios autores (Saeid y Jastrzębska 2018).

En Turquía, se logró incrementar la concentración de Zn en semillas de trigo de 9-10 hasta 30-31 mg/Kg al aplicar ZnSO₄·7H₂O de manera foliar (Yilmaz *et al.* (1997). En suelos con baja disponibilidad de Zn, la aplicación foliar de Zn resultó ser muy efectiva para reducir la concentración de fitato, que es un antinutriente que inhibe la biodisponibilidad del Zn en el ser humano (Cakmak *et al.*, 2010a). El fertilizante más común y usado por los agricultores en programas de fertilización es el ZnSO₄ (Uddin *et al.*, 2014), pero además existen otras formas como el ZnCl₂ y formas quelatadas como el Zn-EDTA (Cakmak, 2008; Wei *et al.*, 2012).

En China la biofortificación de cultivos mediante la aplicación foliar de micronutrientes es una práctica muy popular y eficaz,

principalmente la producción de alimentos enriquecidos con Se (Nawaz *et al.*, 2017, Wu *et al.*, 2015). La aplicación de este elemento se ha llevado a cabo mediante sus formas de selenato y selenito de sodio en cultivo de cereales (Chen *et al.*, 2002, Mao *et al.*, 2014).

Respecto a la biofortificación foliar de Fe, varias investigaciones exitosas se han llevado a cabo en la India en cultivos de cereales. Se logró incrementar de 13.0% a 30% la concentración de Fe en grano de trigo empleando este método (Dhaliwal *et al.*, 2014). Datos de una investigación en cultivo de chícharo en Australia, demostró un aumento significativo en la concentración de Fe al aplicar diferentes dosis mediante aspersion foliar en suelos con deficiencia de este elemento (Kabir *et al.*, 2016). Los fertilizantes que más se usan en las aplicaciones foliares para programas de biofortificación son el FeSO₄ y Fe-EDTA (Kabir *et al.*, 2016).

Estudios realizados mostraron que la concentración de Mn tuvo un incremento considerable al ser aplicado de manera foliar (Ali *et al.*, 2015). En arroz, la aplicación foliar de B aumentó su contenido en el grano en 51.7%, con estos resultados Rehman *et al.* (2014a) que este método era una forma más efectiva de biofortificación que la enmienda de nutrientes al suelo y los tratamiento de semillas.

4.3.4 Aplicación al suelo/fertilización pre-siembra

La forma más común de aplicación de macro y micronutrientes a las plantas es directamente al suelo. La aplicación pre siembra es la adición de fertilizantes antes de depositar la semilla en el suelo o al momento de plantar. Este método de aplicación es efectivo ya que está directamente en la zona de crecimiento de la raíz, sin embargo puede reducir su efectividad debido a las reacciones directas con el suelo (Mortvedt, 1985); también se requiere de dosis más altas ya

que están expuestos a los factores naturales típicos del suelo que merman su eficiencia (Singh, 2007). Unos de los fertilizantes que más se aplican antes de la siembra son los orgánicos y éstos generalmente deben ser incorporados al suelo (Piechota *et al.*, 2014), ya que de no ser incorporados resulta menos efectiva la absorción de micronutrientes. Una manera de asegurar la absorción de nutrientes es mediante la aplicación de quelatos, debido a que no son absorbidos por los coloides del suelo y pueden filtrarse hasta la zona radicular, las formas quelatadas de Mn, Zn y Fe son las más comúnmente aplicadas.

Durante años se tuvo la creencia de que la aplicación de fertilizantes en banda pre siembra solamente amentaba el rendimiento, sin embargo, estudios posteriores demostraron que aplicando fertilizantes por este método con el objetivo de enriquecer la parte comestible fue todo un éxito (Narwal *et al.*, 2010). Estudios realizados en soya demostraron que la biofortificación con micronutrientes en la parte comestible de este cultivo es eficiente (Mao *et al.*, 2014).

Como en la mayoría de los casos, los programas de biofortificación pre siembra están enfocados a los cereales y los estudios publicados se refieren a ellos, sin embargo, esta técnica puede aplicarse de igual forma para incrementar el contenido nutricional de granos de frijol con el objetivo de combatir la desnutrición de los sectores más vulnerables de la sociedad que tienen como alimento base el frijol en sus diversas variedades.

4.3.5 Tratamientos de semillas

Este tratamiento se refiere a la aplicación de uno o más microelementos directamente a las semillas antes de la siembra y la concentración de los micronutrientes que se pueden aplicar son muy pequeñas (Mortvedt, 1985). Este tratamiento consiste en sumergir las semillas por un tiempo

determinado en una solución nutritiva que contenga los elementos con los cuales se desea biofortificar, o también recubriéndolas con micronutrientes Farooq *et al.*, 2012).

Este tratamiento es llamado Nutripriming, y los micronutrientes entran en la semilla mediante la acción osmótica (Imran *et al.*, 2004). También se ha observado que las semillas germinan más rápido y de manera más homogénea (Farooq *et al.*, 2009).

El recubrimiento de semillas, generalmente se refiere a la aplicación de sólidos finamente molidos o líquidos que contienen sólidos disueltos que forman una capa que cubre a la semilla. También se puede emplear la granulación de semillas, que implica la adición de materiales inertes para modificar la forma y el tamaño de la semilla para la siembra de precisión, mientras que en el recubrimiento de semillas, los materiales como microorganismos, reguladores del crecimiento, nutrientes y otros productos químicos se adhieren alrededor de la semilla con la ayuda de algún material pegajoso. (Scott, 1989).

El éxito y la efectividad del recubrimiento de semillas con micronutrientes depende del nutriente utilizado, el material de recubrimiento, el tipo de suelo, la humedad y estado de fertilidad y la relación nutriente-semilla (Halmer, 2008). Varios informes indicaron el potencial de los tratamientos de semillas para mejorar crecimiento de cultivos y rendimientos (Marcar y Graham, 1986. Solo algunas investigaciones se refiere a aumentar el contenido de micronutrientes en las partes comestibles de las plantas; aumentado sus valores nutricionales (Duffner *et al.*, 2014).

Estudios realizados por Johnson *et al.*, (2005) en garbanzo, lentejas, arroz y trigo, el tratamiento en semillas como parte de un programa de biofortifocación, el tratamiento de semillas con Zn incrementó el contenido de este elemento en

1066, 1160, 580 y 900% respectivamente, sobre el control no tratado.

En el caso de tratamiento en semillas para aumentar la concentración de boro, se reporta que una solución de ácido bórico, elevó la concentración en 900, 1566, 700 y 2122% en garbanzos, lentejas, arroz y granos de trigo respectivamente (Johnson *et al.*, 2005). Para el caso de enriquecimiento de semillas con soluciones de MnSO₄, Khalid y Malik (1982) indicaron que el contenido de Mn incrementó significativamente empleando este método.

Varios autores menciona que el tratamiento a semillas en un programa de biofortificación puede ser similar a un programa de aplicación al suelo, y recomiendan que al aplicar u tratamiento en semilla, se complemente con un tratamiento foliar para obtener mejores resultados (Nawaz *et al.*, 2017, Pankaj *et al.*, 2016).

En semillas de frijol, varios estudios mostraron que el tratamiento en semillas no tuvo el efecto esperado para la acumulación de micronutrientes, y además se provocó la inhibición de la germinación y daño en algunas semillas (Roberts, 1948).

Para la implementación de este método de enriquecimiento es necesaria la optimización de condiciones, Farooq *et al.*, 2012 trabajaron con diferentes dosis de micronutrientes, rangos de temperatura, cantidades de agua y requisitos de oxigenación; con el fin de que el procedimiento sea lo más eficiente posible y evitar el daño directo a las semillas.

4.4 OTRAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS QUE AFECTAN LA CONCENTRACIÓN DE MICRONUTRIENTES EN LOS CULTIVOS

Cuando se quiere biofortificar algún cultivo, es necesario tomar en cuenta que factores pueden influir ocasionando un resultado no deseado, las prácticas agronómicas como la rotación de cultivos, labranza, aplicación de macronutrientes, intercalado de cultivos pueden influir en el contenido de micronutrientes en cultivos. Desafortunadamente, hay pocos estudios de dichos tratamientos que consideran la biofortificación de micronutrientes. (Cakmak, 2010).

Otro factor que afecta la concentración de micronutrientes es la aplicación de fertilizantes que puedan estar fácilmente biodisponibles, ya que los microorganismos del suelo fácilmente los atrapan y los incorporan a sus redes tróficas, que muchas veces no involucran a las plantas (Carpena y Bernal, 2007).

Tener en cuenta y monitorear los niveles de salinidad del suelo es una práctica que de no llevarse a cabo, puede afectar el contenido de los micronutrientes; las sales afectan directamente las raíces y la absorción de agua, desencadenando desequilibrios iónicos por la excesiva absorción de sodio y cloruros que bloquean la absorción de iones esenciales y su posterior acumulación en los diferentes tejidos de la planta (Yokoi *et al.*, 2002).

4.4.1 Aplicación de macronutrientes

Varios estudios han demostrado que la fertilización nitrogenada tiene un papel importante en el aumento en la concentración de Fe en la parte comestible de las plantas. El aumento de 47% en grano, se dio debido a la aplicación de N al suelo acompañado de la

aplicación de quelato de Fe (Fe-EDTA, Fe-EDDHA o citrato de Fe) Aciksoz *et al.*, (2011). El Fe y Zn también dependen de la disponibilidad de potasio, pues éste influye sobre la estimulación del crecimiento radical y sobre las poblaciones de microorganismos que contribuyen a la movilidad y captura de estos microelementos (García 2006; Astudillo y Blair 2008). La fertilización fosfórica puede incrementar la concentración de Fe en la semilla, pero tiene el efecto contrario con el Zn. El sinergismo entre el P y el Fe se debe a que comúnmente son absorbidos juntos. Estudios han demostrado que en cultivo de frijol, a medida que en la planta se incrementa el contenido de P, el contenido de Zn disminuye; por tanto las plantas de frijol que son fertilizadas con alto contenido de P, disminuyen su contenido de Zn en la semilla (Astudillo y Blair 2008; Velu *et al.*, 2014).

Con la aplicación de Ca al suelo, se pueden prever cambios importantes en la solución del suelo, esto implica la interacción del calcio con la solubilidad y absorción de microelementos (Tyler y Olsson, 2001).

El manejo adecuado de la fertilización con macronutrientes tiene el potencial mejorar la calidad nutricional de los cultivos, incluidos los micronutrientes acumulados.

4.4.2 Rotación de cultivos

Es un sistema secuencial de un predio cultivado donde se programa el establecimiento de alrededor de uno o dos cultivos principales, seguido de una o más leguminosas o algún otro cultivo secundario. Es una práctica generalizada que trae beneficio a largo plazo (Gutiérrez-Castorena *et al.*, 2018, entre ellos la nutrición y rendimiento de los cultivos (Stockdale y Watson, 2011). Con la rotación de cultivos generalmente se dejan residuos de los cultivos anteriores que aumentan la concentración de

nitrógeno y otros elementos en el suelo, este macronutriente como ya se ha mencionado tiene la característica de influir en la disponibilidad de micronutrientes (Watson *et al.*, 2012). Estudios han demostrado que las leguminosas pueden afectar el pH del suelo, dejando disponible el Mn (Williams y David, 1976), y cuando el cultivo fue una leguminosa perenne con asociaciones micorrízicas, la concentración de selenio aumenta (Grant *et al.*, 2010). Estudios realizados por Fordoński *et al.*, (2015) muestran una mayor acumulación de micronutrientes como cobre, hierro y zinc en la semilla de

cultivos cuando fue sembrado frijol en el ciclo anterior. El efecto positivo del frijol y la soja como cultivos precedentes en el contenido de algunos micronutrientes en grano de trigo fue verificado por Woniak y Makarski (2012).

Algunas investigaciones que han resultado favorables en el centro de México son la relación entre maíz-frijol-girasol o maíz-cártamo, además de utilizar el cultivo de alfalfa como de cobertura y abono verde en rotaciones con maíz, la cual beneficia a la fijación de nitrógeno y el control de malezas (McVay *et al.*, 1989).



4.4.3 Cultivos intercalados

El uso de cultivos con características similares que se complementan para el aprovechamiento de los recursos, es una práctica utilizada pero poco estudiada en relación a los beneficios que trae en el aprovechamiento y absorción de micronutrientes (Zuo y Zhang F., 2009). Zhang *et al.*, 2010a, plantaron leguminosas y

cereales, intercalando garbanzo y trigo, y observaron que se facilitó la absorción de Zn, Fe y Mn. Esta técnica que se ha utilizado más en Europa, ha intercalado gramíneas y leguminosas con el objetivo de incrementar el contenido de micronutrientes, demostrando que las leguminosas mantienen un buen nivel de estos microelementos al estar sujetas a

aplicaciones de nitrógeno Høgh Jensen y Søgaard (2012). También se ha demostrado que intercalando los cultivos empleando patatas de frijol, se ha aumentado considerablemente la concentración de Fe y Zn, lo que da indicios de

que con esta práctica se puede implementar un programa de biofortificación de cultivos Głowacka (2013).



Reynoso, V, 2016

4.4.4 Labranza

Los suelos con poca práctica de labranza tienden a compactarse y a provocar serios problemas para las plantas, uno de ellos es que se limita el desarrollo de las raíces (Busscher y Sojka, 1987), lo que limita la absorción de agua y nutrientes; también existe interferencia en la absorción de micronutrientes por la acumulación de otros nutrientes en la superficie del suelo, tal es el caso de la reducción de la absorción de Zn (Lavedo *et al.*, 2001) por la acumulación de P en las capas superficiales del suelo sin labrar Weil *et al.*, 1988).

La influencia que tiene la labranza con la acumulación de micronutrientes es un proceso largo; estudios han demostrado que se requieren de 2 a 3 ciclos agrícolas para poder ver algún tipo de efecto en la concentración de micronutrientes en la parte comestible de las plantas. Stipesevic *et al.* (2009) informaron de un aumento en la concentración de Zn de 11.7

mg en lotes con labranza convencional al tercer año de haber implementado esta práctica.

Salinas-García *et al.*, 2005, probaron tres tipos de labranza en cultivo de frijol, labranza tradicional (barbecho), labranza mínima (subsuelo-bordeo y destronque-bordeo) y labranza cero; evaluando únicamente la concentración de nitratos, fósforo disponible y potasio extraíble en el suelo.

Se ha reportado también que la no remoción de la materia orgánica dentro del perfil del suelo provoca que el N y K no se incorporen de manera efectiva, lo que limita su disponibilidad (Gál *et al.*, 2007). También se ha encontrado que causa la liberación y degradación acelerada de N, desencadena un impacto negativo en la capacidad de intercambio catiónico (Subbarao *et al.*, 2006).

4.4.5 Manejo del agua

El agua es un factor limitante para la absorción de nutrientes. Pocos estudios muestran los efectos del agua como tal en los programas de biofortificación, Khan *et al.*, 2003 estudiaron los efectos de la sequía en la acumulación de zinc en garbanzo, aunque hubo un ligero aumento en la concentración de este elemento en la semilla, los resultados no fueron significativos. También se ha demostrado que el Fe puede precipitarse como placas de hidróxido férrico (Zhou *et al.*, 2007), que son principalmente lepidocrocita o goetita y tienen una alta capacidad para unir los iones metálicos como Zn^{2+} y Cu^{2+} , lo que reduce su absorción (Chen *et al.*, 1980).

4.5 OBSTÁCULOS Y DESVENTAJAS

Una de las desventajas que se presenta al implementar un programa de biofortificación agronómica, es lo difícil que es determinar hacia cuál de los tejidos de las plantas se irá la mayor cantidad del elemento aplicado, en diversos cultivos los nutrientes aplicados se van a las partes que se eliminan durante el proceso de cosecha, lo que significa una pérdida significativa.

Otra desventaja, es que la mayoría de los vegetales contienen antinutrientes y algunos metales pesados que influyen en la biodisponibilidad de algunos micronutrientes esenciales para los humanos (Welch y Graham, 2005). Por tales motivos son necesarios más estudios que demuestren que los programas de biofortificación con micronutrientes son eficientes para mejorar la nutrición de los seres humanos.

4.6 PERSPECTIVAS Y DESAFÍOS

Los retos que se presentan a los investigadores y productores que desean implementar los programas de biofortificación, son los relacionados con la

conducción de nutrientes hacia las partes de las plantas que sirven de alimento para los seres humanos, en específico y teniendo especial atención en la fitodisponibilidad de nutrientes, la acumulación de éstos en tejidos comestibles y la biodisponibilidad de nutrientes para la nutrición de los seres humanos (Pinto y Ferreira, 2015).

Lo anterior se logra modificando las prácticas agronómicas relacionadas con la aplicación de la fuente fertilizante, la cantidad adecuada y el momento exacto de mayor absorción que esencialmente influyen en la acumulación de los microelementos.

Es importante mencionar que el éxito de la biofortificación depende mucho de la naturaleza bioquímica del nutriente aplicado, ya que ésta determina su eficiencia de transporte y absorción en la sangre, Díaz-Gómez *et al.*, 2017 proponen que las investigaciones deberían de incluir el análisis de nutrientes en los seres humanos, y el análisis de flujo de material que determine el destino de los nutrientes provenientes de la fertilización agronómica con fines de mejorar la nutrición de la población

4.7 CONCLUSIONES

La aplicación agronómica de micronutrientes en leguminosas, se convierte en una alternativa para resolver los problemas de desnutrición y deficiencia de micronutrientes de los sectores vulnerables de la población, aplicando sales minerales a cultivos básicos como el frijol que forman parte de la dieta diaria de los seres humanos.

En general, los resultados de las diferentes investigaciones contribuyen a definir la utilidad y la aplicación de la biofortificación, que promueve la aplicación de micronutrientes. Esta tecnología tiene un gran potencial para controlar la inducción del sistema antioxidante en las plantas de frijol, lo que mejora el rendimiento de

los cultivos, la resistencia al estrés y la acumulación de compuestos antioxidantes en las semillas.

4.8 BIBLIOGRAFÍA

- Aciksoz, S. B., Yazici, A., Ozturk, L., and Cakmak, I.** 2011. Biofortification of wheat with iron through soil and foliar application of nitrogen and iron fertilizers. *Plant and Soil* 349:215-225.
- Aguilera, G., L. I., V. Olalde P., M. Rubí A., R. Contreras.** 2008. Micorrizas arbusculares. *CIENCIA ergo sum*. Vol. 14-3. Noviembre 2007-febrero 2008. Universidad Autónoma del estado de México, Toluca México. 300-306 p.
- Alam, S. M., Z. Iqbal, A. Latif.** 2000. Effect of P and Zn application by fertigation on P use efficiency and yield of wheat. *Tropical Agricultural Research and Extension* 3(2):115-119.
- Ali, A. U., Sarwar, G., Tahir, M. A., and Noorka, I. R.** 2015. Improvement of human health through biofortification of manganese in wheat (*Triticum aestivum* L.) crops. *International Journal of Medicine & Applied Health* 3(1):1-6.
- Almendros, P., Obrador, A., González, D., Álvarez, J. M.** 2015. Biofortification of zinc in onions (*Allium cepa* L.) and soil Zn status by the application of different organic Zn complexes. *Scientia Horticulturae* 186:254-265.
- Ashmaye, S. H., Shaban, Kh. A., and Abd El-Hader, M. G.** 2008. Effects of mineral nitrogen, sulphur, organic and bio-fertilizer on maize productivity in saline soil of Sahl El-Tina. *Minufiya Journal of Agricultural Research* 33(1):195-209.
- Astudillo C, Blair M.** 2008. Contenido de hierro y cinc en la semilla y su respuesta al nivel de fertilización con fósforo en 40 variedades de frijol colombianas. *Agron Colomb.* 26(3):471-476.
- Batten, K., K. Scow, K. Davies, S. Harrison,** 2008. Two invasive plants after soil microbial community composition in

- serpentine grassland. *Biological invasions* 8: 217-230.
- Bell, R. W., Dell, B.** 2008. *Micronutrients for Sustainable Food, Feed, Fibre and Bioenergy Production*. Paris, France: International Fertilizer Industry Association.
- Beltrán-Morales, A., G. Castro-Márquez, F. Ruiz-Espinosa, S. Zamora-Salgado, J. Loya-Ramírez, J. Alcalá-Jáuregui, B. Murillo-Amador, J. García-Hernández.** 2015. Abonos orgánicos de origen marino en la producción de plántulas de tomate. *Agricultura orgánica Octava parte*. Ed. Promep SEP. 18-34 p.
- Bidoli E., R. Talamini, C. Bosetti, E. Negri, D. Maruzzi, M. Montella, S. Franceschi and C. La Vecchia.** 2005. Macronutrients, fatty acids, cholesterol and prostate cancer risk. *Annals of Oncology* 16:152-157.
- Bitocchi E., L. Nanni, E. Bellucci, M. Rossi, A. Giardini, P. S. Zeuli, G. Logozzo, J. Stougaard, P. McClean, G. Attene and R. Papa.** 2012. Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 109:E788-E796.
- Borowska, K. and Koper, J.** 2006. The effect of manure on the selenium content in soil and potato tubers. *Polish Journal of Environmental Studies* 15(2):17-19.
- Buscot F, Varma A.** 2005. *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Springer, Heidelberg.
- Busscher, W. J. and Sojka, R. E.** 1987. Enhancement of sub-soiling effect on soil strength by conservation tillage. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers* 30(4):0888-0892.
- Cakmak, I.** 2008. Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification. *Plant and Soil* 302:1-17.
- Cakmak, I.** 2010. Biofortification of cereals with zinc and iron through fertilization strategy. 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World, August 1-6, Brisbane, Australia, 4-6 pp.
- Cakmak, I., Pfeiffer, W. H. and McClafferty, B.** 2010a. Biofortification of durum wheat with zinc and iron. *Cereal Chemistry* 87(1):10-20.
- Carpena, R.O., M. Pilar Bernal.** 2007. Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Ecosistemas* 16(2): 1-3.
- Cao, X. Y., X. M. Jiang, Z. H. Dou.** 1994. Iodination of irrigation water as a method of supplying iodine to a severely iodine-deficient population in XinJiang, China. *Lancet* 344:107-110.
- Chen, C. C., Dixon, J. B., and Turner, F. T.** 1980. Iron coatings on rice roots: Mineralogy and quantity influencing factors. *Soil Science Society of America Journal* 44:635-639.
- Chen, L., Yang, F., Xu, J. et al.** 2002. Determination of selenium concentration of rice in China and effect of fertilization of selenite and selenate on selenium content of rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:5128-5130.
- Chen, Jen-Hshuan.** 2006. The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility. Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University, Taiwan, R.O.C. 1-11 p.
- Chojnacka, K., Mikulewicz, M., Cieplik, J.,** 2011. Biofortification of food with microelements. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 6 (4):544-548.
- Dai, J. L., Zhang, M., Hu, Q. H., Huang, Y. Z., Wang, R. Q., and Zhu, Y. G.,** 2009. Adsorption and desorption of iodine by

- various Chinese oils: II. Iodide and iodate. *Geoderma* 153:130-135.
- Dai, J. L., Zhu, Y. G., Huang, Y. Z., Zhang, M., and Song, J. L.** 2006. Availability of iodide and iodate to Spinach in relation to total iodine in soil solution. *Plant and Soil* 289:301-308.
- Dhaliwal, S. S., Shukla, A. K., Manchanda, J. S., and Kumar, D.** 2014. Screening of wheat cultivars and fertifortification with zinc, manganese and iron in low fertility soils of Punjab. *Vegetos* 27:139-145.
- Das, S. K.** 2016. Role of micronutrient in rice cultivation and management strategy in organic agriculture-a reappraisal. *Agricultural Sciences* 5:765-769.
- de Valenca, A. W., Bake, A., Brouwer, I. D., and Giller, K. E.** 2017. Agronomic biofortification of crops to fight hidden hunger in sub-Saharan Africa. *Global Food Security* 12:8-14.
- Degryse, F., Shahbazi, A., Verheyen, L., and Smolder, E.,** 2012. Diffusion limitations in root uptake of cadmium and zinc, but not nickel, and resulting bias in the Michaelis constant. *Plant Physiology* 160:1097-1109.
- Diaz-Gomez, J., Twyman, R. M., Zhu, C. et al.** 2017. Biofortification of crops with nutrients: Factors affecting utilization and storage. *Current Opinion in Biotechnology* 44:115-123.
- Dimpka, C. O. and Bindraban, P.** 2015. Fortification on micronutrients for efficient agronomic production. *Agronomy for Sustainable Development* 36:1-26.
- Duffner, A., Hoffland, E., Stomph, T. J., Melse-Boonstra, A., and Bindraban, P. S.** 2014. Eliminating zinc deficiency in rice-based systems. VFRC Report 2014/2. Virtual Fertilizer Research Center, Washington, DC.
- Efremova, M. and Izosimova, A.** 2014. Contamination of agricultural soils with heavy metals. In: Jakobsson C. (Ed.). *Sustainable Agriculture*. Uppsala: Baltic University Press, pp. 250-252.
- El-Ghamry, A. M., Abd El-Hamid, A. M., and Mosa, A. A.** 2009. Effect of farmyard manure and foliar application of micronutrients on yield characteristics of wheat grown on salt affected soil. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 5(4):460-465.
- El Sayed Hamed, E. A., Amen, El-Sh. A., EI-Morsy, A. H., and Tolba M.H.** 2012. Effects of foliar spraying with microelements and different fertilizer sources on quality and yield of *Pisum sativum* L. plant. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science* 2(1):17-24.
- Farahani, S. M., Chaichi, M. R., Mazaheri, D., Afshari, R. T., and Savaghebi, Gh.** 2011. Barley grain mineral analysis as affected by different fertilizing systems and by drought stress. *Journal of Agricultural Science and Technology* 13: 315-326.
- Hazra, G. 2016. Different types of eco-friendly fertilizers: An overview. *Sustainability in Environment*. 1(1):54-70.
- Fordoński, G., Pszczolkowska, A., Krzebietke, S., Olszewski, J., and Okorski, A.** 2015. Yield and mineral composition of seeds of leguminous plants and grain of spring wheat as well as their residual effect on the yield and chemical composition of winter oilseed rape seeds. *Journal of Elementology* 20(4):827-838.
- Farooq, M., Wahid, A., and Siddique, K. H. M.** 2012. Micronutrient application through seed treatments-A review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 12(1):125-142.
- Gál, A.; Vyn, T. J.; Michéli, E.; Kladienko, E. J. and McFee, W. W.** 2007. Soil carbon and nitrogen accumulation with long-term no-till versus moldboard plowing overestimated with tilled-zone sampling depths. *Soil Till. Res.* 96:42-51.

- Garau G, Castaldi P, Deiana S, Campus P, Mazza A, Deiana P, Pais A.** 2012. Assessment of the use potential of edible sea urchins (*Paracentrotus lividus*) processing waste within the agricultural system: influence on soil chemical and biological properties and bean (*Phaseolus vulgaris*) and wheat (*Triticum vulgare*) growth in an amended acidic soil. *J Environ Manage.* 109:12-18.
- García F.** 2006. Interacción entre microorganismos; estructura del suelo y nutrición vegetal. *Cult Cient.* 4:50-55.
- Glowacka, A.** 2013. Uptake of Cu, Zn, Fe and Mn by maize in the strip cropping system. *Plant Soil and Environment* 59(7):322-328.
- Gondek, K., Kopeć, M., and Głab, T.** 2013. Sewage sludge as a source of microelements regarding fodder value of spring wheat grain. *Ecological Chemistry and Engineering Serie A* 20(9):975-985.
- Grant, C. A., Monreal, M. A., Irvine, R. B., Mohr, R. M., McLaren, D. L., and Khakbazan, M.** 2010. Preceding crop and phosphorus fertilization affect cadmium and zinc concentration of flaxseed under conventional and reduced tillage. *Plant and Soil* 333:337-350.
- Gutiérrez-Castorena, E. V., M. C. Gutiérrez-Castorena, C. A. Ortiz-Solorio.** 2015. Manejo integrado de nutrientes en sistemas agrícolas intensivos: revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6(1): 201-215.
- Gupta, U. C. and Lipsett, J.** 1981. Molybdenum in soils, plants and animals. *Advances in Agronomy* 34:73-115.
- Guzmán M. S. H., J. A. Acosta G., M. A. Álvarez-Muñoz, S. García-Delgado y G. Loarca-Piña.** 2002. Calidad alimentaria y potencial nutracéutico del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agricultura Técnica en México* 28:159-173.
- Halmer, P.** 2008. Seed technology and seed enhancement. *Acta Horticulturae* 771:17-26.
- Hazra, G.** 2016. Different types of eco-friendly fertilizers: An overview. *Sustainability in Environment* 1(1):54-70.
- Hazra K.K., Chandra S.** 2014. Mild to prolonged stress increased rice tillering and source-to-sink nutrient translocation under SRI management. *Paddy Water Environ* 12:245-250.
- Hermosillo-Cereceres, M. A., Sánchez-Chávez E., Balandran-Quintana R., Mendoza-Wilson A. M., Guevara-Aguilar A., Muñoz-Márquez E., García-Bañuelos M. L.** 2011. Ionome variation in bean plant growth under different Se forms and application rates. *Journal Food, Agriculture & Environment* 9(3-4): 374-378.
- Hoseinzade, H., Ardakani, M. R., Shahdi, A., Rahmani, H. A., Noormohammadi G., and Miransari, M.** 2016. Rice (*Oryza sativa* L.) nutrient management using mycorrhizal fungi and endophytic *Herbaspirillum seropedicae*. *Journal of Integrative Agriculture* 15:1385-1394.
- Hwang, B. R., E. J. Kim, J. S. Yang, K. Baek.** 2015. Extractive and oxidative removal of copper bound to humic acid in soil. *Environmental Science and Pollution Research* 22:6077-6085.
- Imran, M., Neumann, G., and Römheld, V.** 2004. Nutrient Seed Priming Improves Germination Rate and Seedling Growth Under Submergence Stress at Low Temperature. *International Research on Food Security, Natural Resource Management and Rural Development*, Cuvillier Verlag Göttingen.
- Jiang, X. M., Cao, X. Y., Jiang, J. Y. et al.** 1997. Dynamics of environmental supplementation of iodine: Four years' experience of iodination of irrigation water

- in Hotien, Xinjiang, China. *Archives of Environmental Health* 52(6):399-408.
- Johnson, S. E., Lauren, J. G., Welch, R. M., and Duxbury, J. M.** 2005. A comparison of the effects of micronutrient seed priming and soil fertilization on the mineral nutrition of chickpea (*Cicer arietinum*), lentil (*Lens culinaris*), rice (*Oryza sativa*) and wheat (*Triticum aestivum*) in Nepal. *Experimental Agriculture* 41:427-448.
- Jones, C. and Jacobsen, J.** 2009. Micronutrients: Cycling, testing and fertilizer recommendations. *Nutrient Management Module* 7:1-16.
- Kabata-Pendias, A.** 2010. *Trace Elements in Soils and Plants*, 4th ed. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Kabir, A., Paltridge, N., and Stangoulis, J.** 2016. Chlorosis correction and agronomic biofortification in field peas through foliar application of iron fertilizers under Fe deficiency. *Journal of Plant Interactions* 11(1):1-4.
- Khalid, B. Y. and Malik, N. S. A.** 1982. Presowing soaking of wheat seeds in copper and manganese solutions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 13:981-986.
- Khan, H. R., McDonald, G. K., and Rengel, Z.** 2003. Zinc fertilization improves water use efficiency, grain yield and seed Zn content in chickpea. *Plant and Soil* 249(2):389-400.
- Lavedo, R. S., Porcelli, C. A., and Alvarez, R.** 2001. Nutrient and heavy metal concentration distribution in corn, soybean and wheat as affected by tillage systems in the Argentine Pampas. *Soil and Tillage Research* 62:55-60.
- Lawson, P. G., Daum D., Czauderna, R., Meuser, H., and Härtling, J. W.** 2015. Soil versus foliar iodine fertilization as a biofortification strategy for field-grown vegetables. *Frontiers in Plant Science* 6:450.
- Liu, H., Xu, J., Li, X. et al.** 2015. Effects of microelemental fertilizers on yields, mineral element levels and nutritional compositions of the artificially cultivated *Morchella conica*. *Scientia Horticulturae* 189:86-93.
- McVay, K. A., D. E. Radcliff, W. L. Hargrove.** 1998. Winter legume effects on soil properties and N fertilizer requirements. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53:1856-1862.
- Martínez, L. B., F. I. Pugnaire.** 2009. Interacciones entre comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Ecosistemas* 18(2): 44-54.
- Márquez-Hernández, C., P. Cano-Ríos, I. Y., Chew-Madinaveitia, A. Moreno-Reséndez, N. Rodríguez-Dimas.** 2006. Sustratos en la producción orgánica de tomate cherry bajo invernadero. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 12(2) 183-189.
- Mao, H., Wang, J., Wang, Z., Zan, Y., Lyons, G., and Zou, C.** 2014. Using agronomic biofortification to boost zinc, selenium, and iodine concentrations of food crops grown on the loess plateau in China. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 14(2):459-470.
- Marcar, N. E. and Graham, R. D.** 1986. Effect of seed manganese content on the growth of wheat (*Triticum aestivum*) under manganese deficiency. *Plant and Soil* 96:165-173.
- Melash, A. A., Mengistu, D. K., and Aberra, D. A.** 2016. Linking agriculture with health through genetic and agronomic biofortification. *Agricultural Sciences* 7:295-307.

- Melo A, Ariza P, Lissbrant S, Tofiño, A.** 2015. Evaluation of agrochemicals and bioinputs for sustainable bean management on the Caribbean coast of Colombia. *Agron Colomb.* 33(2): 203-211.
- Mortvedt, J. J.** 1985. Micronutrient fertilizers and fertilization practices. In: Vlek, P. L. G. (Ed.). *Micronutrients in Tropical Foods.* Netherlands: Springer. 221-235 pp.
- Narwal, R., Malik, R., and Dahiya, R.** 2010. Addressing variations in status of a few nutritionally important micronutrients in wheat crop. 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World, August 1-6, Brisbane. 1-3 pp.
- Nawaz, F., Ahmad, R., Ashraf, M. Y., Waraich, E. A., and Khan, S. Z.** 2015. Effect of selenium foliar spray on physiological and biochemical processes and chemical constituents of wheat under drought stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113:191-200.
- Nawaz, F., Ashraf, M. Y., Ahmad, R., Waraich, E. A., and Shabbir, R. N.** 2014. Selenium (Se) regulates seedling growth in wheat under drought stress. *Advances in Chemistry* 2014:7.
- Nawaz, F., Ashraf, M. Y., Ahmad, R., Waraich, E. A., Shabbir, R. N., and Hussain, R. A.** 2016. Selenium supply methods and time of application influence spring wheat (*Triticum aestivum* L.) yield under water deficit conditions. *Journal of Agricultural Science* 155:1-14.
- Narwal, R., Dahiya, R., Malik, R., and Kala, R.** 2012. Influence of genetic variability on zinc, iron and manganese responses in wheat. *Journal of Geochemical Exploration* 121:45-48.
- Pagani, A., Sawyer, J. E., and Mallarino, A.** 2013. Site-specific nutrient management for nutrient management planning to improve crop production, environmental quality, and economic return. *Micronutrient Management*, Chap. 7. NRCS, Iowa State University.
- Pankaj, S. C. and Dewangan, P. K.** 2016. Biofortification: An alternative for zinc and iron deficiency in cereals A review. *International Journal of Advanced Research* 4(5):618-631.
- Pfeiffer WH, McClafferty B.** 2007. HarvestPlus: breeding crops for better nutrition. *Crop Science* 47: S88–S105.
- Philip J. White and Martin R. Broadley.** 2009. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist.* 182: 49-84.
- Piechota, T., Kowalski, M., Sawinska, Z., and Majchrzak, L.** 2014. Assessment of one operation strip tillage and in row liquid organic manure injection in maize. *Fragmenta Agronomica* 31(1):74-82.
- Pinto, E and Ferreira, I. M. P. L. V. O.** 2015. Cation transporters/channels in plants: Tools for nutrient biofortification. *Journal of Plant Physiology* 179:64-82.
- Poblaciones, M. J. and Rengel, Z.** 2016. Soil and foliar zinc biofortification in field pea (*Pisum sativum* L.): Grain accumulation and bioavailability in raw and cooked grains. *Food Chemistry* 212:427-433.
- Preciado-Rangel, P., F. Sánchez, V. Velazco, J. Frías, M. Fortis, J. L. García, E. Rueda, C. Márquez.** 2010. Soluciones nutritivas preparadas con fuentes orgánicas de fertilización. *Agricultura orgánica* 3ra. Parte. Durango, Durango, México. 296-312 p.
- Rehman, A., Farooq, M., Nawaz, A., and Ahmad, R.** 2014a. Influence of boron nutrition on the rice productivity, kernel quality and biofortification in different production systems. *Field Crops Research* 169:123-131.

- Reynoso, V.** 2016. Leguminosas, regeneración para el suelo. Asociación de maíz y frijol (Aecolmar) Via Orgánica S. A. <https://viaorganica.org/15451-2/>
- Rietra, R. P. J. J., Heinen, M., Dimpka, C., Bindraban, P. S.** 2015. Effects of nutrient antagonism and synergism on fertilizer use efficiency. VFRC Report 2015/5. Virtual Fertilizer Research Centre, Washington, DC.
- Rodríguez, E. S., J. A. Crisóstomo, C. Nabais, H. Freitas.** 2009. Belowground mutualists and the invasive ability of *Casia longifolia* in coastal dunes of Portugal. *Biological Invasions* 11: 231-240.
- Römhild V, Neumann G.** 2006. The rhizosphere: contributions of the soil-root interface to sustainable soil systems. In: Uphoff N *et al* (eds) *Biological approaches to sustainable soil systems*. CRC Press, Boca Raton, 91-107 pp.
- Rosado, J. L., Hambidge, K. M., Miller, L. V., Garcia, O. P., and Westcott, J.** 2009. The quantity of zinc absorbed from wheat in adult women is enhanced by biofortification. *Journal of Nutrition* 139:1920-1925.
- Roberts, W. O.** 1948. Prevention of mineral deficiency by soaking seed in nutrient solution. *Journal of Agricultural Science* 38:458-468.
- Roy, R. N., Finck, A., Blair, G. J., and Tandon, H. L. S.** 2006. Plant nutrition for food security. A guide for integrated nutrient management. In: *Sources of Plant Nutrients and Soil Amendments. Fertilizer and Plant Nutrition Biuletin*, Chap. 5. Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Rutkowska, B., Szulc, W., Sosulski, T., and Stępień, W.** 2014. Soil micronutrient availability to crops affected by long-term inorganic and organic fertilizer applications. *Plant, Soil and Environment* 60(5):198-203.
- Saeid, A., M. Jastrzębska** 2018. Agronomic biofortification as a key to plant/cereal fortification in micronutrients. *Food Biofortification Technologies*. Poland. 1-57 p.
- Saha, S., Mandal, B., Hazra, G. C.** 2015. Can agronomic biofortification of zinc be benign for iron in cereals? *Journal of Cereal Science* 65:186-191.
- Salinas-García, J. R., Díaz-Franco, A., Garza-Cano, E., & Garza-Cano, I.** (2005). Efectos de labranza y biofertilización en propiedades del suelo que afectan a la sostenibilidad de la producción de frijol. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(1), 30-34.
- Scott, J. M.** 1989. Seed coatings and treatments and their effects on plant establishment. *Advances in Agronomy* 42:43-83.
- SIAP-Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera** (2014) Anuario estadístico de la producción agrícola 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, D. F. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> (Octubre 2015).
- Sida-Arreola J.P., E. Sánchez-Chávez, G.D. Ávila-Quezada, P.B. Zamudio-Flores, C.H. Acosta Muñiz.** 2015. Iron biofortification and its impact on antioxidant system, yield and biomass in common bean. *Plant Soil Environ.* 61(12): 573-576
- Sida-Arreola, J.P., Sánchez E, Ojeda-Barrios, DL, Flores-Córdova MA, Márquez-Quiroz C, Preciado-Rangel P.** 2017. Can biofortification of zinc improve the antioxidant capacity and nutritional quality

- of beans?. *Emirates journal of food and agriculture* 29: 1-5.
- Sida-Arreola, J.P., E. Sánchez, P. Preciado-Rangel, C. Márquez-Quiroz.** 2017. Does zinc biofortification affects the antioxidant activity in common bean?. *Cogent Food & Agriculture*. 3: 1283725. doi:10.1080/23311932.2017.1283725
- Singh, M. V.** 2007. Efficiency of seed treatment for ameliorating zinc deficiency in crops. *Proceedings of Zinc Crops Conference*, May 24-26, Istanbul, Turkey.
- Singh, M. K. and Prasad, S. K.** 2014. Agronomic aspects of zinc biofortification in rice (*Oryza sativa* L). *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 84(3):613-623.
- Smoleń, S., Ledwożyw-Smoleń, I., and Sady, W.** 2016. The role of exogenous humic and fulvic acids in iodine biofortification in spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant and Soil* 402:129-143.
- Smoleń, S., Ledwożyw-Smoleń, I., and Sady, W.** 2016. The role of exogenous humic and fulvic acids in iodine biofortification in spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant and Soil* 402:129-143.
- Stipesevic, B., Jug, D., Jug, I., Tolimir, M., and Cvijovic, M.** 2009. Winter wheat and soybean zinc uptake in different soil tillage systems. *Cereal Research Communications* 37:305-310.
- Suárez-Martínez S. E., R. A. Ferriz-Martínez, R. Campos-Vega, J. E. Elton-Puente, K. de la Torre-Carbot and T. García-Gasca.** 2016. Bean seeds: leading nutraceutical source for human health. *CyTA-Journal of Food* 14:131-137.
- Stockdale, E. and Watson, C.** 2011. Can we make crop rotations fit for a multifunctional future? *Aspects of Applied Biology* 113:119-126.
- Turner TR, James EK, Poole PS.** 2013. The plant microbiome. *Genome Biol* 14:209.
- Tyler, G. and Olsson, T. 2001. Plant uptake of major and minor mineral elements as influenced by soil acidity and liming. *Plant and Soil* 230:307-321.
- Ujowundu, C. O., Ukoha, A. I., Agha, C. N., Nwachukwu, N., Igwe, K. O. and Kalu, F. N.** 2010. Effects of potassium iodate application on the biomass and iodine concentration of selected indigenous Nigerian vegetables. *African Journal of Biotechnology* 9(42):7141-7147.
- Uyanöz, R.** 2007. The effects of different bio-organic, chemical fertilizers and their combination on yield, macro and micro nutrition content of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Journal of Agricultural Research* 2(2):115-125.
- Vargas-Vázquez M. L. P., J. S. Muruaga-Martínez, P. Pérez-Herrera, H. R. Gill-Langarica, G. Esquivel-Esquivel, M. A. Martínez-Damián, R. Rosales-Serna y N. Mayek-Pérez.** 2008. Caracterización morfoagronómica de la colección núcleo de la forma cultivada de frijol común del INIFAP. *Agrociencia* 42:787-797.
- Velu G, Ortiz-Monasterio I, Cakmak I, Hao Y, Singh RP.** 2014. Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat. *J Cereal Sci.* 59(3):365-372.
- Watson, C. A., Oborn, I., Edwards, A. C. et al.** 2012. Using soil and plant properties and farm management practices to improve the micronutrient composition of food and feed. *Journal of Geochemical Exploration* 121:15-24.
- Wei, Y., Shohag, M. J. I., and Yang, X.** 2012. Biofortification and bioavailability of rice grain zinc as affected by different forms of foliar zinc fertilization. *PLOS ONE* 7(9):e45428.

- Weil, R. R., Bendetto, P. W., Sikora, L. J., and Bandel, V. A.** 1988. Influence of tillage practices on phosphorus distribution and forms in three ultisols. *Agronomy Journal* 80:503-509.
- Welch, R. M., Graham, R. D., and Cakmak, I.** 2013. Linking agricultural production practices to improving human nutrition and health. *Second International Conference on Nutrition*, FAO and WHO, pp. 1-39.
- Williams, C. H. and David, D. J.** 1976. Effects of pasture improvement with subterranean clover and superphosphate on the availability of trace metals to plants. *Australian Journal of Soil Research* 14:85-93.
- Woźniak, A. and Makarski, B.** 2013. Content of minerals, total protein and wet gluten in grain of spring wheat depending on cropping systems. *Journal of Elementology* 18(2):297-305.
- Wu, Z., Bañuelos, G. S., Lin, Z. et al.** 2015. Biofortification and phytoremediation of selenium in China. *Frontiers in Plant Science* 6:136.
- Yilmaz, A., Ekiz, H., Torun, B.** 1997. Effect of different zinc application methods on grain yield and zinc concentration in wheat cultivars grown on zinc-deficient calcareous soils. *Journal of Plant Nutrition* 20(4-5):461-471.
- Yokoi, S., A. Bressan, P. Mike.** 2002. Salt stress tolerance of plants. *JIRCAS Working Report*. 25-33.
- Zhang, F., Shen, J., Zhang, J., Zuo, Y., Li, L., and Chen, X.** 2010a. Rhizosphere processes and management for improving nutrient use efficiency and crop productivity: Implications for China. *Advances in Agronomy* 107:1-32.
- Zhao, F. J. and McGrath, S. P.** 2009. Biofortification and phytoremediation. *Current Opinion in Plant Biology* 12:373-380.
- Zhou, X. B., Shi, W. M., and Zang, L. H.** 2007. Iron plaque outside roots affects selenite uptake by rice (*Oryza sativa* L.) grown in solution culture. *Plant and Soil* 290:17-28.
- Zuo, Y. and Zhang, F.** 2009. Iron and zinc biofortification strategies in dicot plants by intercropping with gramineous species. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 29:63-71.

Biofortificación en vid

5

Pérez Leal, Ramona; Rodríguez Roque, María Janeth; Soto Parra, Juan Manuel; Orduño Cruz, Nuvia;
Yáñez Muñoz, Rosa María; Sánchez Chávez; Esteban.

5.1 Biofortificación	93
5.2 Agricultura y Biofortificación	93
5.3 Enfoques transgénicos	94
5.4 Intervención agronómica en vid hacia la fortificación	94
5.5 Influencia del anillado sobre la fisiología y bioquímica de la vid	95
5.6 Efecto del raleo de hoja y altura del dosel sobre fotosíntesis y crecimiento de vid	96
5.7 Terroir y metabolismo de la vid	97
5.8 Bibliografía	98

5

Biofortificación en vid

Pérez Leal, Ramona; Rodríguez Roque, María Judith; Soto Parra, Juan Manuel; Orduño Cruz, Nuvia; Yáñez Muñoz, Rosa María; Sánchez Chávez, Esteban.

5.1 BIOFORTIFICACIÓN

La biofortificación es un proceso mediante el cual se incrementa la concentración de elementos esenciales en la parte comestible en los productos cosechados mediante la intervención agronómica, mejoramiento genético (fitomejoramiento) o ingeniería genética (White y Broadley, 2005; Hotz, 2013). Pachón (2010) la define como el proceso mediante el cual los cultivos mejoran sus características agronómicas y su nivel nutricional. Por otra parte, Yin *et al.* (2012), indican que es una estrategia biológica, cuyo objetivo es el incremento de los micronutrientes contenidos en las partes comestibles de las plantas, animales o microorganismos a través del cultivo o el uso de la biotecnología.

Sin embargo autores como Huang *et al.*, en el 2012 la mencionan como una nueva estrategia en la producción agrícola moderna, la cual presenta tres enfoques principales que abarcan: 1) la reducción en la concentración de los antinutrientes (metabolitos vegetales, tales como el ácido fítico y polifenoles), que inhiben la absorción de Fe y Zn, 2) el aumento en las concentraciones de otros compuestos, tales como la inulina y fructanos que favorecen la absorción del Fe y Zn, y 3) el incremento directo de la concentración de Fe y Zn en la parte comestible del vegetal.

Se han realizado investigaciones de biofortificación en cultivos tales como frijol [*Phaseolus vulgaris* (L.)], maíz [*Zea mays* (L.)], trigo [*Triticum aestivum* (L.)], cebada [*Hordeum vulgare* (L.)], camote [*Ipomoea batatas* (L.)], papa [*Solanum tuberosum* (L.)], arroz [*Oryza sativa* (L.)] y yuca [*Manihot esculenta* (Crantz.)], en los cuales se ha buscado incrementar el contenido de hierro y zinc, beta-carotenos, lisina, y triptófano, estos

directamente relacionados con la nutrición humana (Monserrate-Rojas *et al.*, 2009).

5.2 AGRICULTURA Y BIOFORTIFICACIÓN

Dentro de las opciones de biofortificación el fitomejoramiento puede aumentar los niveles de nutrientes en cultivos básicos para alcanzar los niveles requeridos para mejorar la nutrición humana, sin comprometer rendimiento o rasgos agronómicos preferidos por los agricultores. El proceso de desarrollo del cultivo implica examinar el germoplasma para determinar la diversidad genética disponible, genotipos progenitores precursores, desarrollar y evaluar germoplasma denso en micronutrientes, realizar estudios genéticos y desarrollar marcadores moleculares para reducir los costos y acelerar el ritmo de reproducción. Después de que se hayan desarrollado líneas prometedoras, se prueban en varios lugares en los entornos objetivo para determinar la interacción genotipo x entorno (GxE): la influencia del entorno en crecimiento en la expresión de micronutrientes (Monserrate-Rojas *et al.*, 2009).

Sida-Arreola *et al.*, En el 2015 menciona tres puntos principales que se requieren para implementar un programa de biofortificación de cultivos con éxito son: 1) que los cultivos biofortificados deben ser de alto rendimiento y rentable para el agricultor; 2) los cultivos biofortificados deben mostrar eficacia para disminuir la problemática de malnutrición en los seres humanos; 3) el cultivo biofortificado debe ser aceptado por los agricultores y los consumidores en la región de destino.

En algunos países como Ruanda y República Democrática del Congo, los fitomejoradores ya han desarrollado nuevas variedades de frijol con concentraciones de Fe por encima de 94 mg/g. Esto se logró mediante un programa de

investigación internacional de apoyo a la investigación y desarrollo de cultivos biofortificados de HarvestPlus (Blair *et al.*, 2013). Los resultados mostraron una buena retención de micronutrientes después del procesamiento, e igual o mayor rendimiento agronómico, lo cual indica que el frijol común puede ser un cultivo prometedor para la biofortificación de Fe (Bouis y Welch, 2010).

5.3 ENFOQUES TRANSGÉNICOS

En cultivos donde el nutriente objetivo no existe naturalmente en los niveles requeridos en las decenas de miles de variedades en bancos de germoplasma, el mejoramiento de plantas transgénicas es un enfoque prometedor para producir cultivos biofortificados con el nutriente deseado y los rasgos agronómicos. . Por ejemplo, el arroz transgénico de hierro y zinc se ha desarrollado y probado en ensayos de campo confinados que pueden proporcionar un incremento de ambos nutrientes (Trijatmiko *et al.*, 2016). El arroz dorado, que contiene beta caroteno, puede proporcionar más del 50% para la vitamina A. A pesar de estar disponible como un prototipo desde principios de 2000, sin embargo, el arroz dorado no se ha introducido en ningún país, en gran parte debido al alto riesgo procesos de aprobación reguladores adversos (Wessler y Zilberman, 2014). Si bien estas variedades transgénicas tienen un tremendo potencial nutricional, la liberación a los agricultores es de varios años en el futuro, y depende de la aprobación a través de procesos nacionales de bioseguridad y regulación.

5.4 INTERVENCIÓN AGRONÓMICA EN VID HACIA LA BIOFORTIFICACIÓN

Las prácticas de viñedo más utilizadas para mejorar la composición de la uva y el vino son el raleo y adelgazamiento de racimos, adelgazamiento de bayas y defoliación

en la zona de racimo. La eliminación tradicional de hojas en la zona de racimos se lleva a cabo principalmente desde el cuajado hasta el comienzo de maduración, pero como una práctica innovadora también podría realizarse antes en la temporada de crecimiento (alrededor de la floración y el cuajado). La eliminación de las hojas basales y completamente funcionales en la floración previa reduce el aporte de carbohidratos a las flores en comparación con las vides no defoliadas, lo que lleva a una reducción en el cuajado. En consecuencia, normalmente se obtiene una menor acidez valorable pero mayores sólidos solubles y pH en comparación con las vides no defoliadas. Además, una frescura notable, mayor el contenido de alcohol y el sabor mejorado podrían ser las principales características del vino obtenido después de la eliminación de la hoja, en el caso de 'Sauvignon Blanc'. En un estudio de defoliación de la zona de racimo sobre 'Istrian Malvasia', Bubola y Persuric no encontraron diferencias significativas en el rendimiento, que alcanzó 3.51 kg por vid después de la eliminación de la hoja después de la floración. Se mostró un aumento en sólidos solubles (22.1 frente a 22.6 ° Brix para control frente a eliminación de hojas); por otro lado, la acidez titulable y el pH disminuyeron ligeramente en comparación con el control. Se demostró la influencia de la eliminación de hojas en el perfil fenólico de la uva: los glucósidos de quercetina, flavan-3-oles y los ácidos hidroxicinámicos fueron significativamente más altos después del tratamiento de defoliación de la zona de agrupación al 100% en comparación con el control en un estudio de tres años en 'Pinot noir'.

La eliminación de las hojas superiores en los brotes en el momento del cuajado de fruto causa un retraso en la fotosíntesis, como consecuencia de lo cual la acumulación de azúcar en las bayas es limitada, ya que las hojas jóvenes superiores

son más activas fotosintéticamente que las hojas en la parte inferior del dosel. Además, la eliminación de las hojas superiores en los brotes permite que las hojas basales intercepten más luz y por lo tanto aumenten su actividad fotosintética. Sin embargo, los racimos están sombreados por las hojas restantes, por lo que la degradación del ácido málico se reduce y las uvas son consecuentemente más ricas en acidez. Además, los vinos son más bajos en alcohol pero abundantes en frescura. Además, la eliminación de las hojas podría aumentar la síntesis de compuestos fenólicos, principalmente de flavonoides y flavonoles (Rescic *et al.*, 2016).

Se sabe que las prácticas vitícolas influyen en los metabolitos secundarios. La primera explicación es que la calidad de las bayas (es decir, la composición química y / o la coloración de las frutas) es muy sensible al microclima. Los viñedos están sujetos a un gran número de prácticas de gestión, incluida la orientación y el espaciado de las hileras, densidad, poda, recorte, labranza, manejo de la superficie del suelo o manipulación de la estructura del dosel entre otros, lo que lleva a cambios en el microclima del viñedo. Hay muchas maneras de manejar la estructura del dosel: el desplume basal de la hoja es una práctica de viticultura utilizada en todo el mundo para mejorar el microclima de los cúmulos. Tradicionalmente se realiza con los objetivos principales de mejorar el microclima del racimo, reducir la pudrición de la uva (*Botrytis cinerea* y la pudrición ácida) y obtener una mejor maduración, ya que esta práctica mejora la exposición de racimos a la luz solar. El recorte de cabeza es el corte de las puntas de los brotes en crecimiento. El objetivo principal de esta operación es eliminar las hojas no fotosintéticas. Otros beneficios de esta práctica son reducir la transpiración, inducir la lignificación de la planta, equilibrar el desarrollo de ramas y aumentar el flujo de aire y el

aislamiento dentro del follaje. La relación entre dosel, microclima y metabolitos secundarios producidos por la planta, incluyendo precursores de aroma y su vinculación con el sabor del vino no son bien conocidos. Los factores que influyen en el proceso de maduración y consecuentemente la composición de la uva y la calidad del vino están relacionados con las condiciones climáticas tales como precipitación, temperatura, viento y exposición al sol (Hernández-Orte, 2015). Complementariamente, las técnicas de manejo del dosel de la vid son útiles para adaptar el estado hídrico de la vid y la absorción de nutrientes durante la temporada de crecimiento, y así afectar la calidad del vino.

5.5 INFLUENCIA DEL ANILLADO SOBRE LA FISIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DE LA VID

Roper and William en 1989 mencionan que el anillado del tronco después del invierno (remover el anillo de floema) aumenta el tamaño de la baya y mejora la madurez del fruto (coloración de la baya anterior) (o acumulación de azúcar), en un estudio posterior se demostró el efecto combinado de anillado y aspersión de ácido giberélico (GA3) en la hoja de vides cultivadas. Los datos indicaron que GA3 mitigó el efecto supresor del anillado en la hoja y concluye que esto pudo haber sido asociado con la concentración de carbohidratos en la hoja.

Para mejorar la composición química de las uvas y los vinos, se ha desarrollado una práctica de viñedo basada en el marchitamiento en la planta, llamada Doble Maduración Raisonné (DMR). Esta técnica se caracteriza por un corte de caña deliberado similar al de poda de invierno, 2 a 3 semanas antes de la cosecha. El agua de los racimos sobre la caña cortada se evapora y, por consiguiente, la concentración de azúcares aumenta en las bayas. Además, la acidez en las bayas permanece alta, según lo

informado por Corso *et al.*, 2013 mientras que el catabolismo de los dos ácidos principales (málico y tartárico) se reduce. Las vides reaccionan a DMR como una condición de estrés y por lo tanto los mecanismos de defensa se activan a través de una mayor síntesis de metabolitos secundarios. Además, DMR acelera la maduración de las bayas y de los fenólicos, presentes principalmente en la piel de la uva, lo que más tarde da como resultado una textura mejorada de la piel, lo que permite una liberación más fácil de los compuestos fenólicos en el mosto. Por lo tanto, los vinos son más ricos en extracto y contenido de alcohol y generalmente se evalúan como bastante redondos.

5.6 EFECTO DEL RALEO DE HOJA Y ALTURA DEL DOSEL SOBRE FOTOSÍNTESIS Y CRECIMIENTO DE VID

El recubrimiento del dosel y la eliminación de la hoja son prácticas de manejo comúnmente utilizadas en los viñedos para aumentar la penetración de la luz y los plaguicidas en la zona de la fruta, reduciendo así la incidencia de la enfermedad.

Algunas investigaciones sugieren que se produce un aumento en la fotosíntesis cuando se eliminan las hojas, y esto puede compensar la reducción del área foliar, pues se ha demostrado que permite una mayor penetración de fungicidas y luz en el dosel y aumenta el movimiento del aire a través del mismo, reduciendo así la incidencia de enfermedades en el fruto (Hunter y Visser 1990, Gubler *et al.*, 1991). La mejora en la exposición de la fruta a la luz directa aumenta su temperatura (Smart y Sinclair 1976), lo que ayuda a la descomposición del ácido málico y mejora la relación azúcar: ácido del mosto resultante (Ruffner *et al.*, 1975). En climas fríos, la exposición mejorada también puede dar como

resultado una mejora en el color de la baya (antocianinas) (Dokoozlian y Kliewer 1996, Phelps 1999). La eliminación de la hoja reduce la posible superficie de asimilación de CO₂, lo que potencialmente disminuye las tasas de fotosíntesis y afecta el presupuesto de carbono de la vid (Candolfi-Vasconcelos and Koblet 1991). Los valores de entre 7 y 14 cm² de área foliar por gramo de fruta a menudo se citan como necesarios para madurar adecuadamente la fruta, dependiendo del entorno en el que se cultiva la vid (Smart y Robinson 1991, Jackson y Lombard 1993). Sin embargo, la reducción potencial en la fotosíntesis después de la eliminación de la hoja puede no seguir un patrón lineal, ya que las viñas suelen llevar hojas en exceso (a menudo sombreadas) (Intrieri *et al.*, 1997). Las vides también tienen la capacidad de compensar la eliminación de las hojas mediante el crecimiento del follaje de reemplazo y la estimulación de las hojas existentes para que funcionen de manera más eficiente. Cuando se eliminan las hojas, la tasa de fotosíntesis de una sola hoja del follaje restante normalmente aumenta (Hofäcker 1978; Hunter y Visser 1988; Candolfi-Vasconcelos y Koblet 1991; Petrie *et al.*, 2000). Intrieri *et al.* (1997) investigaron el efecto de la eliminación de las hojas sombreadas en la fotosíntesis de la vid completa de una enredadera y llegaron a la conclusión de que una vid podría mantener su tasa de fotosíntesis a pesar de que se había eliminado el 27% del área foliar.

Petrie *et al.* En el 2003 mencionan que la parte inferior del dosel contribuye más que la parte superior del dosel a la fotosíntesis de la vid completa, y que el rendimiento de la fruta, el contenido de azúcar, las reservas de carbohidratos de la vid y los pesos de poda siguieron tendencias similares a las observadas para la fotosíntesis, lo que sugiere que aunque hubo alguna compensación fotosintética, los

tratamientos de defoliación tuvieron un efecto negativo en el crecimiento de la vid

Por otra parte Talaverano *et al.* 2016 mencionaron que la madurez de la uva en las plantas defoliadas tiene una concentración fenólica más baja y semillas más pequeñas y más oscuras.

Zoecklein *et al.* en 1998 encontraron que la eliminación de hojas en la zona de frutas aumenta la concentración del total y Glicósidos libres de fenol versus control en vides Riesling y Chardonnay. Además, Reynolds *et al.* en 1989 encontraron que los vinos obtenidos de uvas defoliadas presentan notas frutales más altas de acuerdo con los catadores y que los valores más altos en la concentración de compuestos de aroma libres se lograron en las uvas de plantas con deshoje, a excepción de Chardonnay. Mencionan también correlaciones significativas y positivas entre los precursores aromáticos de los terpenos presentes en las uvas y su forma liberada en los vinos.

5.7 TERROIR Y METABOLISMO DE LA VID

Es necesario un conocimiento más amplio de los factores ambientales y tecnológicos que limitan el rendimiento de la vid y la calidad del vino. La variabilidad intrínseca asociada con diversos factores (genotipo, manejo de cultivos, suelo y clima) dificulta la zonificación espacial efectiva que permite la selección a medida de los procesos más adecuados para mejorar la calidad del vino y fortalecer el terroir de un determinado viñedo. Terroir, definida como una región espacial identificable que otorga al vino su carácter distintivo, abarca un gran número de variables de diversa naturaleza, como el tipo de suelo, el clima y el medio ambiente, que a menudo muestran interacciones fuertes.

La importancia de la influencia del suelo,

principalmente en el estado hídrico de las plantas, que desempeña un papel básico en la expresión del terroir, es ampliamente reconocida para impulsar la interacción entre el agua y la disponibilidad de nutrientes.

El calor y la radiación del sol pueden influir en la tasa de reacciones metabólicas y también pueden causar estrés. En particular, de acuerdo con Bureau *et al.* en el 2000 y Belancic *et al.* en 1997, la exposición al sol juega un papel importante en las variaciones de la composición volátil de las uvas. Se ha informado que altos niveles de precursores de terpenos se producen en uvas muy maduras. Aunque su proporción no está directamente relacionada con las propiedades organolépticas de las uvas, la concentración de compuestos glicosilados en las uvas podría ser un indicador de su potencial aromático. Hasta la fecha, se han realizado pocos estudios centrados en el efecto del medio ambiente o el estado del agua de la vid, en la síntesis de precursores del aroma glicosídico. Se ha encontrado que la exposición de las uvas al sol puede llevar a un aumento en la concentración de terpenos tanto libres como enlazados.

En cuanto al efecto del agua, los resultados son contradictorios. McCarthy y Coombe en 1985 encontraron una tasa significativamente menor de acumulación de precursores de terpenos en la maduración de uvas Riesling bajo riego, mientras que Escalona *et al.* en 1999 encontraron correlaciones positivas entre el riego y el potencial de aroma en la cosecha en uvas Tempranillo. Otros autores, como Koundouras *et al.* en el 2006 encontraron que una disponibilidad limitada de agua en la planta promueve la síntesis de precursores en las uvas Agiorgitiko.

La mayoría de los estudios encontraron que el contenido total de glucósidos depende de la

cosecha, y que hay variaciones sustanciales año tras año en el aroma potencial de las uvas. Comparando la suma de glicósidos en los principales grupos de compuestos aromáticos en diferentes años, se observa que los norisoprenoides, los terpenos y los fenoles volátiles se ven particularmente afectados.

Estas investigaciones nos indican que la biofortificación de vid es viable, tomando en cuenta la definición de White y Broadley en el 2005 donde menciona que esta es un proceso mediante el cual se incrementa la concentración de elementos esenciales en la parte comestible en los productos cosechados mediante la intervención agronómica, mejoramiento genético (fitomejoramiento) o ingeniería genética, así como la de Pachón (2010) que la define como el proceso mediante el cual los cultivos mejoran sus características agronómicas y su nivel nutricional.

5.8 BIBLIOGRAFÍA

- Belancic A, Agosin E, Ibacache A, Bordeu E, Baumes R, Razungles.** 1997. Influence of sun exposure on the aromatic composition of Chilean Muscat grape cultivars Moscatel de Alejandria and Moscatel rosada. *Am J Enol Vitic* **48**:181 – 186.
- Blair, M.W., Izquierdo, P., Astudillo, C., Grusak, M.A.** 2013. A legume biofortification quandary: variability and genetic control of seed coat micronutrient accumulation in common beans. *Frontiers in Plant Science* **4**.
- Bouis, H.E., Welch, R.M.** 2010. Biofortification—a sustainable agricultural strategy for reducing micronutrient malnutrition in the global south. *Crop Science* **50**:S-20-S-32.
- Bureau SM, Razungles AJ and Baumes RL.** 2000. The aroma of Muscat of Frontignan grapes: Effect of the light environment of vine or bunch on volatiles and glycoconjugates. *J Sci Food Agric* **80**:2012 – 2020.
- Candolfi-Vasconcelos MC, Koblet W.** 1991. Influences of partial defoliation on gas exchange parameters and chlorophyll content of field-grown grapevines: mechanisms and limitations of the compensation capacity. *Vitis* **30**, 129–141.
- Corso M, Ziliotto F, Rizzini FM, Teo G, Cargnello G and Bonghi C.** 2013. Sensorial, biochemical and molecular changes in Raboso Piave grape berries applying ‘Double Maturation Raisonnée’ and late harvest techniques. *Plant Sci* **208**:50–57.
- Dokoozlian NK, Kliewer WM.** 1996. Influence of light on grape berry growth and composition varies during development. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **121**, 869–874.
- Escalona JM, Flexas J, Schultz HR and**

- Medrano H.** 1999. Effect of moderate irrigation on aroma potential and other markers of grape quality, in *First ISHS Workshop on Water Relations of Grapevines, Proceedings*, ed. by Ruhl EH and Schmid J. International Society Horticultural Science, Leuven, pp. 261–267. [SEP]
- Gubler WD, Bettiga LJ, Heil D.** 1991. Comparisons of hand and machine leaf removal for the control of *Botrytis* bunch rot. *American Journal of Enology and Viticulture* 42, 233–236.
- Hernandez-Orte Purificacion, Belen Concejero, Jesus Astrain, Blanca Lacau, Juan Cacho and Vicente Ferreira.** 2015. Influence of viticulture practices on grape aroma precursors and their relation with wine aroma. *J Sci Food Agric*; 95: 688–701 DOI 10.1002/jsfa.6748
- Hofäcker W.** 1978. Investigations on the photosynthesis of vines, influence of defoliation, topping, girdling and removal of grapes. *Vitis* 17, 10–22.
- [SEP] **Hotz C.** 2013. Biofortification. In: Benjamin, C. (ed.) *Encyclopedia of Human Nutrition* (Third Edition). Waltham. Academic Press. P 175-181. [SEP]
- Huang Y, Yuan L, Yin X.** 2012. Biofortification to Struggle Against Iron Deficiency. In: Yin X, Yuan L. (eds.). *Phytoremediation and Biofortification*. Springer Netherlands. 59-74 p.
- Hunter JJ, Visser JH.** 1990. The effect of partial defoliation on growth characteristics of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon I. Vegetative growth. *South African Journal of Enology and Viticulture* 11, 18–25.
- Hunter JJ, Visser JH.** 1988. The effect of partial defoliation, leaf position and development stage on the vine on the photosynthetic activity of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *South African Journal of Enology and Viticulture* 9, 9–15.
- Intrieri C, Poni S, Rebucci B, Magnanni E.** 1997. Effects of canopy manipulations on whole-vine photosynthesis: results from pot and field experiments. *Vitis* 36, 167–173.
- Jackson DI, Lombard PB.** 1993. Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 44, 409–430.
- Koundouras S, Marinos V, Gkoulioti A, Kotseridis Y and van Leeuwen C.** 2006. Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of nonirrigated cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). Effects on wine phenolic and aroma components. *J Agric Food Chem* 54:5077 – 5086.
- McCarthy MG and Coombe BG.** 1985. Water status and wine grape quality. *Acta Hort* 171:447–456.
- Monserate-Rojas FA, Pachón H, Hyman GG, Vesga VAL.** 2009. Metodologías para seleccionar zonas de intervención con cultivos biofortificados. *Pan Am J Public Health*. 26: 419-428.
- Pachón H.** 2010. El impacto nutricional de cultivos biofortificados. AgroSalud, CIAT, CIMMYT, CIP, CLAYUCA. Fecha de consulta: 26/06/2014. Disponible en: http://www.agrosalud.org/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=99999999&gid=295
- Phelps GW.** 1999. The influence of site, crop load and cluster exposure on Pinot noir fruit composition in Canterbury. MSc thesis, Lincoln University, New Zealand.
- Petrie PR, Trought MCT, Howell GS.** 2000. Influence of leaf ageing, leaf area and crop load on photosynthesis, stomatal conductance and senescence of grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) leaves. *Vitis* 39, 31–36.

- Petrie Paul R., A.B., Michael C. T. Troughton, G. Stanley Howell and Graeme D. Buchan.** 2003. The effect of leaf removal and canopy height on whole-vine gas exchange and fruit development of *Vitis vinifera* L. Sauvignon Blanc. *Functional Plant Biology*, 30, 711–717
- Smart RE, Robinson MD.** 1991. (Eds) 'Sunlight into the wine.' (Winetitles: Adelaide)
- Smart RE, Sinclair TR.** 1976. Solar heating of grape berries and other spherical fruits. *Agricultural Meteorology* 17, 241–259.
- Rescic Jan, Maja Mikulic-Petkovsek and Denis Rusjan.** 2016. The impact of canopy managements on grape and wine composition of cv. 'Istrian Malvasia' (*Vitis vinifera* L.). *J Sci Food Agric* 2016; 96: 4724–4735 DOI 10.1002/jsfa.7778
- Reynolds AG.** 1989. Riesling grapes respond to cluster thinning and shoot density manipulation. *J Am Soc Hort Sci* 114:364–368. ^[SEP]
- Roper and William.** 1989. Net CO₂ Assimilation and Carbohydrate Partition of Grapevine Leaves in Response to Trunk Girdling and Gibberellic Acid Application. *Plant Physiol* 89,1136-1140).
- Ruffner HP, Koblet W, Reast D.** 1975. Gluconeogenesis in reifenden Beeren von *Vitis vinifera*. *Vitis* 13, 319–328.
- Sida-Arreola, J. P.; Sánchez-Chávez, E.; Muñoz-Márquez, E. and Flores-Córdova, M. A.** 2015. Parámetros nitrogenados, biomasa y rendimiento en frijol biofortificado con hierro y zinc. In: Loredó, O. C.; Lara, M. J. L.; Beltrán, L. S. y Valdez, C. R. D. (Comp.). Memorias del XL Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. 383-387 pp.
- Talaverano M. Inmaculada, Daniel Moreno, Francisco J. Rodríguez-Pulido, ^[SEP]M. Esperanza Valdés, Esther Gamero, M. José Jara-Palacios, Francisco J. Heredia.** 2016. Effect of early leaf removal on *Vitis Vinifera* L. cv. Tempranillo seeds during ripening based on chemical and image analysis. *Scientia Horticulturae* 209 148–155
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.06.013>
- Trijatmiko, K.R., Duenas, C., Tsarkirpaloglou, N., et al.** 2016. Biofortified indica rice attains iron and zinc nutrition dietary targets in the field. *Sci. Rep.* 6, 19792.
- Wessler, J., Zilberman, D.** 2014. The economic power of the Golden Rice opposition. *Environ. Dev. Econ.* 19, 724–742.
- White, P.J., Broadley, M.R.** 2005. Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends in Plant Science* 10:586-593.
- Yin X, YUAN L, LIU Y, LIN Z.** 2012. Phytoremediation and Biofortification: Two Sides of One Coin. P 1-6. In: Yin X, Yuan L. (eds.) Phytoremediation and Biofortification. Springer.
- Zoecklein BW, Wolf TK, Duncan SE, Marcy JE and Jasinski Y.** 1998. Effect of fruit zone leaf removal on total glycoconjugates and conjugate fraction concentration of Riesling and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) grapes. *Am J Enol Vitic* 49:259–265.

Avances recientes en la biofortificación con Fe y Zn en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

6

Sida Arreola, Juan Pedro; Muñoz Márquez, Ezequiel; Sánchez Chávez, Esteban.

6.1 Resumen	103
6.2 Introducción	103
6.3 El consumo de frijol y sus beneficios sobre la salud	104
6.4 La biofortificación como estrategia para mejorar la calidad nutricional de los cultivos	105
6.5 Biofortificación con Fe y Zn	106
6.6 Perspectivas futuras	112
6.7 Conclusiones	113
6.8 Bibliografía	114

6

Avances recientes en la biofortificación con Fe y Zn en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Sida Arreola, Juan Pedro; Muñoz Márquez, Ezequiel; Sánchez Chávez, Esteban.

6.1 RESUMEN

La biofortificación, el proceso de aumentar la biodisponibilidad de nutrientes en cultivos alimentarios, proporciona una estrategia sostenible para suministrar micronutrientes a las poblaciones rurales de países en desarrollo. Para esto, se emplean métodos de reproducción convencionales y transgénicos. Un cultivo clave en estudios de biofortificación con micronutrientes, principalmente Fe y Zn, es el frijol común. Esta leguminosa es uno de los alimentos básicos más importante a nivel mundial y es ampliamente cultivada para el consumo humano en países de África y América Latina, así como en el sur de Europa. Algunos de los resultados obtenidos, así como los recientes éxitos en la liberación de variedades de frijol mejoradas, proporcionan evidencia de que la biofortificación es una estrategia prometedora para mejorar la calidad nutricional de cultivos básicos. Esto da como resultado una mejora en la salud del consumidor y la prevención en la aparición de enfermedades crónico degenerativas. En este capítulo se presentan estudios recientes en biofortificación con Fe y Zn en frijol, desde los primeros estudios en el mejoramiento genético, hasta el uso de nanopartículas en biofortificación agronómica y algunos avances en el área de la biofortificación biotecnológica. Así mismo, se plantea la posibilidad de aplicar el conocimiento generado en el área de la edición génica para estudios posteriores de biofortificación en cultivos básicos, como lo es el frijol común.

Palabras clave: Biofortificación; micronutrientes; *Phaseolus vulgaris*.

6.2 INTRODUCCIÓN

La población a nivel mundial depende principalmente de una dieta basada en el consumo de plantas para tener un desarrollo normal y mantener su estado de salud

en óptimas condiciones; sin embargo, países de América y África principalmente, padecen actualmente deficiencias nutricionales y dependen de los cultivos básicos como fuente de alimentación (Vinoth y Ravindhran, 2017). En 2009, la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó las deficiencias de vitamina A, Zn y Fe entre los principales factores de riesgo responsables de las muertes en el mundo (OMS 2009). Unos años después, la Declaración de Roma sobre Nutrición 2014 y el Instituto Internacional de Investigación sobre Políticas Alimentarias (IFPRI) (2016) confirmaron que los desafíos de salud relacionados con la dieta estaban aumentando en todos los niveles económicos del mundo. Las enfermedades relacionadas con la dieta son en gran medida causadas por deficiencias de estos elementos y afectan negativamente la salud, el bienestar y el estatus económico de los seres humanos (Thompson y Cohen 2015).

Estas deficiencias nutricionales han sido ocasionadas, en parte, por la agricultura moderna que impulsa, principalmente, un mayor rendimiento a menor costo, dejando de lado la calidad nutricional de los cultivos (Sands *et al.*, 2009). Actualmente se han desarrollado estrategias para aumentar el contenido de micronutrientes en la parte comestible de las plantas con el objetivo de mejorar la nutrición de la población, principalmente en países en vías de desarrollo. Esta estrategia es la biofortificación (Bouis y Welch, 2010), la cual es considerada como una estrategia sostenible y rentable para abordar la malnutrición a nivel mundial porque se centra en los alimentos básicos que se consumen diariamente (Dwivedi *et al.*, 2012). Uno de los alimentos básicos más importante a nivel mundial es el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), ya que es la leguminosa de grano más ampliamente cultivada para el consumo humano en países de África y América

Latina, así como en el sur de Europa (Blair e Izquierdo, 2012).

El frijol es una fuente importante de nutrientes para más de 300 millones de personas, que representa el 65% del total de proteína consumida, el 32% de la energía y una buena fuente de micronutrientes, como Fe, Zn, tiamina y ácido fólico (Petry *et al.*, 2015). El frijol es conocido como la "carne de los pobres", debido a su alto contenido de proteínas, minerales y vitaminas (Blair, 2013). Se estima que el frijol común tiene de 4 a 10 veces la cantidad de Fe y 2 a 3 veces la cantidad de Zn en comparación con el arroz (Pfeiffer y McClafferty, 2007). Otra ventaja del uso del frijol en los programas de biofortificación es que las semillas se consumen enteras después de hervirlas. Por lo tanto, todos los componentes principales de la semilla de frijol común podrían ser objetivos de la biofortificación: la cubierta de la semilla, los cotiledones y el embrión (Blair *et al.*, 2013).

En este capítulo se presentan estudios recientes en biofortificación con Fe y Zn en frijol, desde los primeros estudios en el mejoramiento genético, hasta el uso de nanopartículas en biofortificación agronómica y algunos avances en el área de la biofortificación biotecnológica. Así mismo, se plantea la posibilidad de aplicar el conocimiento generado en el área de la edición génica para estudios posteriores de biofortificación con cultivos básicos, como lo es el frijol común.

6.3 EL CONSUMO DE FRIJOL Y SUS BENEFICIOS SOBRE LA SALUD

El frijol común es la leguminosa más ampliamente cultivada para el consumo humano principalmente en África y América Latina, así como en el sur de Europa (Blair e Izquierdo, 2012). El consumo per cápita varía con cada país productor y consumidor y también entre las regiones dentro de un país

dependiendo de las preferencias del consumidor, pero puede ser tan alto como 66 kg por persona al año en Ruanda y partes del oeste de Kenia (Broughton *et al.*, 2003). Los niveles promedio en América son de 4 a 5 kg per cápita al año en los Estados Unidos > 10 kg per cápita al año en Brasil hasta 35 kg per cápita al año en Nicaragua. Estas cantidades de frijol pueden proporcionar cantidades sustanciales de proteínas y calorías en la dieta. En términos nutricionales, los frijoles son comúnmente llamados la "carne del pobre" por su bajo precio como fuente de proteína y su rico contenido de minerales (especialmente Fe y Zn) y vitaminas (Beebe *et al.*, 2013).

El frijol es fuente importante de nutrientes para más de 300 millones de personas alrededor del mundo y representa el 65% del total de proteína consumida, el 32% de la energía y una importante fuente de micronutrientes, como por ejemplo, Fe (Fe), Zn (Zn), tiamina y ácido fólico (Petry *et al.*, 2015). Se estima que el frijol común tiene de 4 a 10 veces la cantidad de Fe y 2-3 veces la cantidad de Zn en comparación con el arroz (Pfeiffer y McClafferty, 2007). Además, contiene una amplia variedad de compuestos bioactivos y antioxidantes que, junto con su alto contenido en micronutrientes, ayudan a combatir problemas de salud como la anemia por deficiencia de Fe, obesidad, el diabetes, enfermedades crónico degenerativas y hasta algunos tipos de cáncer (Macz-Pop *et al.*, 2006).

Uno de los grupos de compuestos bioactivos más importante del frijol son los flavonoides, los cuales tienen diversas funciones, entre las que destaca su acción inhibidora del crecimiento tumoral y algunos tipos de cáncer (Huber *et al.*, 2016). Estos, junto con los ácidos fenólicos y los taninos, confieren a este alimento una capacidad antioxidante superior. Los flavonoides

principales contenidos en el frijol crudo y cocido son catequina, kaempferol, quercetina,

miricetina y procianidina (Huber *et al.*, 2016). Algunos estudios clínicos han demostrado un efecto beneficioso del consumo de frijoles sobre el índice glucémico y un papel protector contra el establecimiento de diabetes tipo 2 debido a su alto contenido de polifenoles que les confiere un efecto antioxidante significativo. Además, varias líneas de evidencia sugieren que el consumo de frijol disminuye el riesgo de cardiopatía isquémica y enfermedades cardiovasculares, cáncer de estómago y próstata, control de peso y obesidad, atenuación del estrés, ansiedad y depresión en poblaciones ancianas, entre otros roles (Mudryj *et al.*, 2014). Estos beneficios asociados al consumo de frijol se pueden potenciar mediante el consumo de frijol biofortificado, ya que de esta manera se asegura una mejor nutrición y, por consiguiente, mejoras en la salud de los consumidores (García-Bañuelos *et al.*, 2014).

6.4 LA BIOFORTIFICACIÓN COMO ESTRATEGIA PARA MEJORAR LA CALIDAD NUTRICIONAL DE LOS CULTIVOS

En años recientes se han desarrollado estrategias para mejorar el contenido de micronutrientes en la parte comestible de las plantas con el objetivo de mejorar la nutrición de la población, principalmente en países en vías de desarrollo.

Esta estrategia es la biofortificación (Bouis y Welch, 2010), la cual es considerada como una estrategia sostenible y rentable para abordar la malnutrición a nivel mundial y sobre todo en países en desarrollo porque se centra en los alimentos básicos que se consumen diariamente (Dwivedi *et al.*, 2012). Las estrategias de biofortificación se basan principalmente en el manejo agronómico de los cultivos, el uso de

herramientas biotecnológicas y el mejoramiento genético (Figura 1).

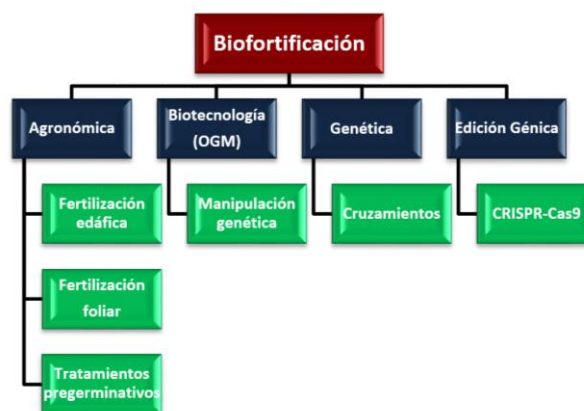


Figura 1. Estrategias de biofortificación en cultivos básicos

Para lograr el objetivo de la biofortificación, se han empleado diversos cultivos, tales como, arroz, maíz, trigo, tomate, lechuga y leguminosas como la soya, las lentejas y el cultivo principal entre las leguminosas, que es el frijol (Beebe *et al.*, 2010). Una de las razones de la importancia del frijol es su calidad nutricional, ya que es más alta que la de los cereales, con cantidades importantes de minerales y vitaminas acumuladas en las semillas (Sperotto y Ricachenevsky, 2017). Una de las principales investigaciones realizadas en torno a la biofortificación fue desarrollada por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), a través de su programa HarvestPlus, que desarrolló frijoles rojos moteados. Los frijoles arbustivos moteados rojos, denominados líneas NUA (Nutrición Andina) se caracterizan por un mayor contenido mineral, mayor rendimiento, resistencia a la sequía y ataques de enfermedades (CIAT 2008). Generalmente, los frijoles comunes contienen 3.14-12.07 mg/g de Fe y <1.89-6.24 mg/g de Zn (Marles 2017); sin embargo, los genotipos de NUA contienen 40-90 mg/kg de Fe y 10-35 mg/kg de Zn (CIAT, 2008). Desde su lanzamiento, los frijoles NUA han sido evaluados bajo diferentes condiciones de campo en varias regiones, incluyendo

América Latina, África oriental y meridional como parte de los programas HarvestPlus y Agrosalud para biofortificación (CIAT 2008; Blair *et al.*, 2010). Los resultados han demostrado, por ejemplo, que NUA35 y NUA56 contienen un contenido de Zn en semilla mucho mayor que los cultivares comerciales comúnmente cultivados en Uganda, Ruanda, Colombia, Bolivia, Costa Rica y Guatemala cuando se prueban bajo diferentes tipos de clima, altitud y suelo (Sharma *et al.* 2017).

germoplasma de frijol común para contenido mineral.

Una colección de germoplasma es una muestra del germoplasma de una especie, tomada de tal manera que representa la diversidad genética más amplia posible en un número específico de accesiones. En la evaluación de más de mil accesiones, se encontraron un rango de 34 a 89 partes por millón (ppm), con un promedio de 55 ppm en cuanto al contenido de Fe (Tabla 1). El contenido de Zn del frijol es uno de los más

Tabla 1. Contenido mineral (ppm) de frijol cultivado y silvestre

MINERAL	SILVESTRE (N=119)		CULTIVADO (N=1031)	
	Media ± EE	Máximo	Media ± EE	Máximo
BORO	18 ± 5.9	58	10 ± 1.8	18
CALCIO	3,207 ± 1,327	6,450	1,466 ± 412	3,152
COBRE	6 ± 2.0	12	9 ± 1.8	14
HIERRO	60 ± 10.2	96	55 ± 8.3	89
MANGANESO	23 ± 9.0	74	15 ± 4.4	29
SODIO	16 ± 7.1	38	12 ± 4.0	50
FÓSFORO	6.044 ± 705	7,782	3,684 ± 696	7,095
AZUFRE	2,354 ± 314	3,073	2,120 ± 259	3,078
ZINC	29 ± 4.5	43	35 ± 5.0	54

En términos de biofortificación, el aumento del contenido mineral en frijol tiene sus ventajas, ya que el contenido básico de Fe en grano va de 55 hasta 110 ppm y de 21 hasta 54 ppm de Zn, así las pruebas de desarrollo iniciales son más exitosas que en los cereales (Blair e Izquierdo, 2012). La mayor parte del trabajo de biofortificación mineral ha sido mediante mejoramiento genético convencional y algunos estudios en tecnología transgénica, pero los primeros productos derivan de líneas de cultivo que usan variedades estándar y organismos no modificados genéticamente (Pfeiffer y McClafferty, 2007). El primer paso para determinar si el estado de micronutrientes del frijol puede mejorarse es verificar el grado de variabilidad genética de las especies en el contenido mineral. Para este propósito, Beebe *et al.* (2013) evaluaron la colección de

altos entre los vegetales. La evaluación de la colección de accesiones de frijol reveló un rango de 21 a 54 ppm en contenido de Zn, con un valor promedio de 35 ppm (Tabla 1). Estos datos indican que existe suficiente variabilidad genética para mejorar el contenido de Fe en aproximadamente un 80% y el contenido de Zn en aproximadamente un 50% (Beebe *et al.*, 2013).

6.5 BIOFORTIFICACIÓN CON Fe Y Zn

Dos de los principales micronutrientes en estudios de biofortificación son Fe y Zn, debido a que más de la mitad de la población a nivel mundial presentan deficiencias de estos dos elementos (Blair *et al.*, 2012). Por su parte, el Fe es un micronutriente esencial para casi todos los organismos vivos (Bashir *et al.*,

2013) y su deficiencia es la más común entre las deficiencias de micronutrientes en todo el mundo, lo cual provoca la aparición de anemia en la población (Finkelstein *et al.*, 2017). La anemia es difícil de combatir a través de suplementos de Fe o alimentos procesados. Por esta razón, se está investigando para aumentar la acumulación de Fe en alimentos básicos como arroz, maíz, trigo y leguminosas (Blair e Izquierdo, 2012) usando biofortificación, que es el proceso de mejoramiento o ingeniería genética para aumentar el contenido de nutrientes en un cultivo (Blair, 2013). Esta técnica de biofortificación es considerada una estrategia sostenible y costeable para abordar los problemas de nutrición en los países en desarrollo, debido a que se enfoca en los alimentos básicos que se consumen diariamente (Dwivedi *et al.*, 2012). La biofortificación de cultivos básicos para aumentar su contenido de micronutrientes, tiene un enfoque de salud pública para el control de las deficiencias de micronutrientes, principalmente de Fe y Zn en los países en desarrollo (Bouis y Welch, 2010), debido a que las concentraciones de minerales en la mayoría de los suelos no son suficientes para suministrar a los cultivos con altos contenidos de minerales (Blair, 2013).

Por su parte, el Zn es un micronutriente involucrado en el funcionamiento de más de 300 enzimas y juega un papel importante en la expresión génica y actúa como un estabilizador de las estructuras de membrana y los componentes celulares (Palmgren *et al.*, 2008). El Zn es un elemento importante para la productividad de los cultivos (Cakmak, 2009). Actualmente, existe el problema de la deficiencia de Zn en los cultivos (Cakmak, 2008), debido a la baja solubilidad de Zn en los suelos. La biofortificación es el proceso que tiene como objetivo aumentar el contenido de micronutrientes en las porciones comestibles de las plantas cultivadas, ya sea a través del fitomejoramiento (biofortificación genética) o la

fertilización (biofortificación agronómica) (White, 2016). Esto incluye tanto la reproducción de nuevas variedades con el potencial genético para acumular un alto contenido de Zn y el uso de fertilizantes de Zn para aumentar su eficiencia de utilización y por lo tanto, el contenido de Zn en la semilla (Montalvo *et al.*, 2016). En esta sección se verán los aspectos más importantes de los estudios de biofortificación agronómica, mejoramiento genético y biofortificación biotecnológica en frijol.

6.5.1 Biofortificación agronómica

La biofortificación agronómica mediante fertilización ayuda a mejorar la concentración de micronutrientes de la planta sin modificar su composición genética (Almendros *et al.*, 2015). La biofortificación agronómica representa una vía inmediata y efectiva para mejorar las concentraciones de micronutrientes en la parte comestible de los cultivos básicos (de Valença *et al.*, 2017). La biofortificación agronómica se centra en cultivos básicos como los cereales y algunas leguminosas, porque dominan las dietas en todo el mundo, especialmente entre grupos vulnerables a deficiencias de micronutrientes (Saltzman *et al.*, 2013). Existen algunos factores que determinan el éxito de la biofortificación agronómica para aliviar las deficiencias de micronutrientes entre la población, tales como la biodisponibilidad de nutrientes en diferentes etapas, la absorción de nutrientes dentro de la planta y la translocación a las partes comestibles de la planta. También influyen factores como la biodisponibilidad de nutrientes en los alimentos ya procesados para su ingesta, así como de su capacidad de absorber y utilizar los nutrientes por parte de quien los consume (De Valença *et al.*, 2017). En ese sentido, la biofortificación agronómica se considera como una opción para aumentar la disponibilidad de micronutrientes y principalmente para complementar los estudios de fitomejoramiento (García-Banuelos *et al.*,

2014), mediante la aplicación de micronutrientes al suelo, al follaje principalmente y mediante el tratamiento pregerminativo de semillas con soluciones que contienen altas concentraciones de micronutrientes.

6.5.1.1 Fertilización edáfica

La biofortificación a través de la aplicación de minerales al suelo ha aumentado el Zn (Shehu y Jamala, 2010) y los niveles de selenio (Hawkesford y Zhao, 2007) en cereales. Por otro lado, los fertilizantes con Fe que se añaden de forma edáfica se ven obstaculizados por la rápida unión a las partículas del suelo, lo que impide su absorción por la planta (Hirschi, 2009). Se pueden obtener mejores resultados con la aplicación de quelatos tales como FeEDTA porque más Fe permanece biodisponible en solución (Khoshgoftarmanesh *et al.*, 2010). Otros factores importantes a considerar son los tipos de suelo, la etapa de crecimiento y los genotipos, ya que desempeñan un papel clave en el uso eficiente de los fertilizantes de Zn (como ZnSO₄); por lo tanto, estos factores deben tenerse en cuenta durante la aplicación de fertilizantes (Sadeghzadeh, 2013).

En un estudio realizado con frijol ejotero (Sánchez *et al.*, 2017), se aplicaron tratamientos de Zn en forma de DTPA-Zn y ZnSO₄ de forma edáfica. Los resultados indicaron que la aplicación de Zn aumentó la concentración de Zn en la semilla, así como la capacidad antioxidante, ambos atributos deseables para mejorar las condiciones de salud de los consumidores. Molina *et al.* (2016) biofortificaron plantas de frijol caupí con quelatos de Fe y Zn (Fe-EDDHA) (Zn-EDTA) y observaron que la aplicación quelatos dio como resultado un aumento en el contenido de Fe y Zn en la semilla, el rendimiento en grano, así como también en los valores de actividad antioxidante. El selenio (Se) es otro de los micronutrientes esenciales en la alimentación humana y también forma parte de los esfuerzos que se realizan por

incrementar su concentración en los cultivos básicos (de Figueiredo *et al.*, 2017). Con el objetivo de incrementar la concentración tanto de Se como de Zn, sin que se viera afectada la concentración de ambos en la semilla del frijol común, De Figueiredo *et al.* (2017) llevaron a cabo una investigación en la cual biofortificaron Zn y Se. Encontraron que las semillas de frijol respondieron positivamente a los tratamientos de Zn y Se en la acumulación de estos micronutrientes y además con el tratamiento de Zn se redujo el nivel de ácido fítico. Por lo tanto, los enfoques agronómicos a través de la fertilización han demostrado ser efectivos para mejorar los niveles de Zn y Se en los cultivos alimentarios (White, 2016).

Aunque el uso de fertilizantes convencionales se ha difundido alrededor del mundo, actualmente se está haciendo uso de la nanotecnología para la elaboración de fertilizantes minerales nanoencapsulados, esto debido a la baja eficiencia en la absorción de los fertilizantes químicos, lo cual hace necesario encontrar formas químicas que proporcionen a la planta una mejor absorción y transporte. Tal es el caso de las nanopartículas (NP), las cuales tienen esta característica, debido a su pequeño tamaño y mayor área de superficie (Liu y Lal, 2015). El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos considera a la nanotecnología como un área importante para aumentar la producción agrícola y la calidad de los cultivos destinados a la alimentación (Liu y Lal, 2015). En un estudio reciente de Medina-Velo, *et al.* (2017), se aplicaron nanopartículas de Zn comerciales en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), cultivadas en macetas con suelo enriquecido con productos hechos a base de Zn. Se observó un aumento en el crecimiento radicular y también aumentó el contenido de Zn, S, Mo, Mg, B y Mn. Recientemente, las NP de óxido de Fe se usaron para sustituir a los fertilizantes comerciales de Fe y así, disminuir la deficiencia de Fe en

plantas de cacahuete (Rui *et al.*, 2016). Las nanopartículas empleadas como fertilizantes se pueden hacer de formas, tamaños, estructuras aleadas, estructuras con núcleo recubierto y funcionalización de la superficie, así como una estructura más activa para el crecimiento mejorado de las plantas y la absorción de raíces, lo cual sigue siendo un área activa de investigación (Li *et al.*, 2016).

Por otro lado, la aplicación de fertilizantes inorgánicos u orgánicos en combinación con bioestimulantes de plantas, resultó en mejores propiedades fisicoquímicas de los suelos y aumentó el crecimiento y el rendimiento de los cultivos (Mumtaz *et al.*, 2017; Thonar *et al.*, 2017; Moloto *et al.*, 2018). El aumento de la solubilización de nutrientes junto con el crecimiento y el rendimiento de las plantas mediante la aplicación de bioestimulantes se plantea como una opción viable.

6.5.1.2 Fertilización foliar

Dentro de la biofortificación agronómica, otro método utilizado es la aplicación foliar de fertilizantes, ya que se considera ser más eficiente en la absorción de micronutrientes en comparación con la aplicación edáfica (Zou *et al.*, 2012; Boonchuay *et al.*, 2013). Algunos estudios indican que, aunado a la aplicación de micronutrientes, el suministro adecuado de nitrógeno (N) es clave para aumentar la concentración de Fe y Zn en semilla y brote (Aciksoz *et al.*, 2011). Otros estudios demuestran que la biofortificación foliar con fertilizantes de Zn es más efectiva en comparación con la aplicación edáfica (Shivay *et al.*, 2016). En ese sentido, Ram *et al.* (2016) observaron que, con la aplicación foliar de Zn en plantas de frijol, el contenido de Zn en la semilla aumentó de 66 a 78 mg kg⁻¹.

Recientemente, mediante la utilización de la nanotecnología, se han desarrollado fertilizantes con nanopartículas de micronutrientes, esto con

el objetivo de hacer aún más eficiente su absorción por las plantas y en consecuencia, aumentar su concentración en la parte comestible de las plantas. En un estudio relacionado, Deshpande *et al.* (2017) aplicaron nanopartículas (NP) de óxido de Zn vía foliar (ZnO-NP) y observaron que el Zn se libera en el interior del estoma y se transloca a través del floema con mayor absorción en las hojas, después en el tallo y las semillas (Deshpande *et al.*, 2017). Además, se observaron efectos benéficos asociados a la aplicación foliar de NP, ya que la translocación de ZnO-NP de las hojas a raíces de *Vigna radiata* (frijol mungo), dio como resultado un aumento en la población microbiana de la rizosfera, nodulación y actividad de enzimas movilizadoras de fosfato (fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, fitasa y deshidrogenasa) cuando se analizaron a una concentración de 10 mg.L⁻¹ (Raliya *et al.*, 2016).

6.5.1.3 Tratamientos pregerminativos

Otra de las técnicas de biofortificación agronómica empleada, es la aplicación de micronutrientes mediante el tratamiento de semillas. Las semillas pueden tratarse sumergiéndolas en una solución nutritiva durante un tiempo específico o pueden ser recubiertas con micronutrientes (Farooq *et al.*, 2012). El tratamiento pregerminativo de las semillas mediante la aplicación de soluciones que contienen Fe, Zn u otros micronutrientes (*priming*) es una forma práctica de aumentar su concentración antes de la siembra y contribuir a un mejor crecimiento de las plántulas (Noulas *et al.*, 2018). Las semillas con alto contenido de Zn pueden mantener el crecimiento del cultivo e incrementar el rendimiento a través de una mejor germinación, vigor de las plántulas y tolerancia al estrés, particularmente en suelos con deficiencia de Zn (Noulas *et al.*, 2018).

Además, la producción de granos y semillas biofortificados con Zn puede traer efectos beneficiosos para la salud humana ayudando a

superar la malnutrición en poblaciones con dietas basadas en cereales y leguminosas (Alloway, 2008). Palchoudhury *et al.* (2018) usaron NPs de óxido de Fe y NP híbridas de óxido de Fe decoradas con Pt para modelar soluciones de *priming* (pretratamiento mediante inmersión en soluciones nutritivas) en semillas de leguminosas, entre ellas frijol negro y rojo (*Phaseolus vulgaris* L.), para investigar su efecto sobre el crecimiento de raíces. Se encontró que las nanopartículas de óxido de Fe aumentaron el crecimiento de la raíz en un 88-366% a bajas concentraciones ($5.54 \cdot 10^3 \text{ mg L}^{-1}$ Fe). Este enfoque puede ser aplicado para el desarrollo de nanofertilizantes enfocados en la producción de cultivos alimentarios biofortificados, principalmente los de alto consumo, como el frijol común.

6.5.2 Mejoramiento genético

Existe una variación genética natural para la concentración de nutrientes en el frijol, lo cual ofrece la oportunidad de desarrollar cultivares con mejores perfiles nutricionales (Pinheiro *et al.*, 2010). Se ha encontrado que algunas regiones genómicas del frijol son importantes para la acumulación de Fe y Zn, sobre todo en los cromosomas Pv01, Pv02, Pv06, Pv08, Pv10 y Pv11, de acuerdo con estudios de QTL realizados en cruzamientos y en poblaciones mapeadas (Blair *et al.*, 2010). Las técnicas de mejoramiento genético en frijol enfocadas a incrementar el contenido de micronutrientes, consisten en identificar las variedades con los valores más altos tanto de Fe, como de Zn y realizar cruzamientos con variedades con otras características deseables, como puede ser la resistencia a la sequía o resistencia a enfermedades (Blair *et al.*, 2012).

Las variedades con las que se iniciaron estas investigaciones son silvestres y para ello el CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) mantiene colecciones de germoplasma de frijol en la sede central del programa de frijol

en Colombia y sus oficinas regionales de África en Uganda (4.000 accesiones actualmente) y Malawi (3.000 accesiones actualmente). Los fitomejoradores de todo el mundo se apoyan en estas colecciones para mejorar continuamente los rasgos específicos. Además, se han investigado cuatro especies hermanas de *Phaseolus*, *P. coccinues*, *P. acutifolius*, *P. dumosus* y *P. costaricensis*, con el objetivo de acceder a genes únicos para la selección local (Beebe *et al.*, 2013).

Dentro de las investigaciones para el mejoramiento genético del frijol, dentro del programa de Biofortificación de HarvestPlus, el CIAT mapeó diferentes poblaciones de frijol para mejorar la concentración de Fe y Zn en estos dos grupos de genes (Blair *et al.*, 2009, 2010, 2011). Además de la población de RIL (líneas endogámicas recombinantes, por sus siglas en inglés) de grupos intergenéticos 'DOR364' x 'G19833', Cichy *et al.* (2009) desarrollaron un mapa genético de la población de RIL de grupos intergenéticos 'G19833' x 'AND696'. Asimismo, se creó otro mapa genético andino con la población RIL derivada de la cruce de 'G21242' x 'G21078'. Se realizó un anclaje entre este mapa y los mapas de referencia previamente publicados, los cuales se distribuyeron en 11 LG (Blair *et al.*, 2010).

Además, se utilizó la población de RIL Mesoamericano 'G14519' x 'G4825' para examinar la herencia de las concentraciones de Fe y Zn (Blair *et al.*, 2010). Así mismo, Galeano *et al.* (2012) desarrollaron un nuevo mapa de enlaces utilizando la población grupos intragenéticos Mesoamericano 'DOR364' x 'BAT477'. En este mapa se evaluaron un total de 2706 marcadores moleculares. Con el objetivo de crear un mapa de consenso para el mapeo fino en frijol común, el mapa 'DOR364' x 'BAT477' se fusionó con los mapas de vinculación previamente existentes de los núcleos 'BAT93' x 'JALO EEP558' y las

poblaciones centrales 'DOR364' 'BAT477'. De este modo, el mapa de consenso consistió en un Los rasgos genéticos relacionados con la herencia de concentración de Fe, parecen estar

Tabla 2. QTL's asociados con concentraciones de Fe y Zn en la semilla del frijol

Elementos	Mapeo de población	Número de líneas	Número de marcadores	Número de QTL's	Referencias
Zn	RIL	73	5	Dos marcadores asociados con Zn	Gelin et al., 2007
Fe, Zn	RIL	87	236	13 Fe, 13 Zn	Blair et al., 2009
Fe, Zn	RIL	77		6 Fe, 4 Zn	Cichy et al., 2009
Fe, Zn	RIL	110	114	8 Fe, 9 Zn	Blair et al., 2010
Fe, Zn	RIL	100	122	6 Fe, 3 Zn	Blair et al., 2011
Fe, Zn	F2:3	120	57	1 Zn, 2 Fe	Guzmán-Maldonado et al., 2004
Fe				5 SNP (polimorfismos de un nucleótido)	Katuuramu et al., 2018
Zn				6 SNP	Katuuramu et al., 2018

Modificado de [Kumar et al. \(2015\)](#). RIL: Recombinant imbred lines; SNP: single nucleotide polymorphism

total de 1,060 marcadores distribuidos en 11 LG ([Blair et al., 2012](#)). De acuerdo con un informe del CIAT de 2008, en Sudáfrica se realizaron cruzamientos entre frijoles NUA (frijol andino) y cultivares locales para aumentar el contenido de micronutrientes. En caso de que las variedades NUA no fueran aceptadas por la población, los rasgos mejorados para acumulación de Fe y Zn se habrían incluido en los cultivares locales.

Así mismo, [Blair et al. \(2010\)](#) y [Blair e Izquierdo \(2012\)](#) desarrollaron variedades de frijol con alto contenido de Fe y Zn utilizando técnicas de retrocruzamiento, para posteriormente probar el rendimiento agronómico y las concentraciones de Fe y Zn. Observaron que la concentración de estos micronutrientes dependió del sitio de plantación, pero tuvieron concentraciones más altas, en promedio de 18 a 23 mg/kg que las semillas parentales. El mayor desafío en los estudios de biofortificación con frijol es mantener una alta concentración de Fe y Zn en un buen número de genotipos para cubrir climas y tipos de suelo ([Blair et al., 2010](#)).

asociados con la concentración de Zn, lo que indica que genes similares están involucrados en la carga de micronutrientes en las semillas y que el desarrollo para ambos minerales se puede hacer simultáneamente ([Blair et al., 2012](#)). También se ha asociado la concentración de Fe y Zn con la faseolina, que es una proteína de almacenamiento en la semilla, mientras que la ferritina, proteína de almacenamiento de Fe, fue asociada con un QTL ([Blair et al., 2012](#)). Los QTL asociados a ferritina son candidatos interesantes, ya que la investigación realizada para aumentar la expresión de ferritina en las especies de Poaceae ha dado buenos resultados ([Sperotto et al., 2012](#)). Otro posible gen candidato sería el de la reductasa de quelato de Fe, importante para la absorción de Fe en las raíces ([Blair et al., 2012](#)).

En estudios realizados mediante técnicas moleculares, [Cichy et al. \(2005\)](#) dieron como resultado la localización de un único gen dominante que controla el alto contenido de Zn en el frijol blanco. [Velu et al. \(2006\)](#) encontraron la prevalencia de la acción del gen aditivo en el mijo perla, controlando el contenido de Fe y Zn del grano. En este tipo de

estudios, se emplea el análisis del locus de rasgos cuantitativos (QTL), el cual proporciona un enfoque importante para comprender los factores genéticos y conocer los genes involucrados con la variación natural de las concentraciones de Fe y Zn (Ghandilyan *et al.*, 2009). En la tabla 2 se muestran algunos de los QTL's relacionados con la concentración de Fe y Zn en la semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

El mapeo de loci de caracteres cuantitativos (QTL) también ha demostrado ser de utilidad para mejorar la composición nutricional de Fe y Zn en poblaciones recombinantes de *P. vulgaris* (Beebe *et al.*, 2000), lo cual indica un aumento potencial del 80% en el contenido de Fe y Zn de las semillas. Además, los estudios en poblaciones de *P. vulgaris* andinas mapearon la variación fenotípica en el contenido de Fe y Zn en tres grupos de ligamiento, lo que sugiere un gran potencial para aumentar la composición de micronutrientes de esta especie (Cichy *et al.*, 2009). En otro estudio, Blair *et al.* (2009) identificaron 26 QTL asociados con Fe y Zn en *P. vulgaris*.

6.5.3 Biofortificación biotecnológica

Los enfoques de modificación genética en variedades de frijol representan una alternativa para mejorar el potencial genotípico (Mayer *et al.*, 2008) aunque en el caso de *Phaseolus vulgaris*, aún carece de herramientas prácticas para la investigación genómica. Aunque se ha

logrado un progreso importante, la tasa de recuperación de líneas transgénicas sigue siendo baja (Hnatuszko-Konka *et al.*, 2014). Hablando de biofortificación, los estudios de modificación genética se enfocan en aumentar la expresión de genes relacionados con la adquisición de minerales y los genes que sustentan la abundancia de minerales en una forma biológicamente accesible (Connorton *et al.*, 2017).

También se ha explorado la proliferación de mutaciones para desarrollar fenotipos de frijol bajos en contenido de ácido fítico (Campion *et al.*, 2009) y los mutantes resultantes han demostrado una biodisponibilidad mayor de Fe, con un rendimiento agronómico aceptable (Campion *et al.*, 2013).

6.6 PERSPECTIVAS FUTURAS

La ingeniería genómica de plantas ha desarrollado el sistema CRISPR (por sus siglas en inglés Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) mediado por la nucleasa bacteriana Cas9 (Belhaj *et al.*, 2015). Este sistema CRISPR/Cas9 permite generar mutaciones en un sitio deseado para incorporar fragmentos de ADN deseado (Ma *et al.*, 2016). La edición génica mediante el uso de CRISPR-Cas9 es otra de las opciones al aumento de la concentración de micronutrientes en los cultivos, ya que no requiere transformación (Malnoy *et al.*, 2016; Wolt *et al.*, 2016).

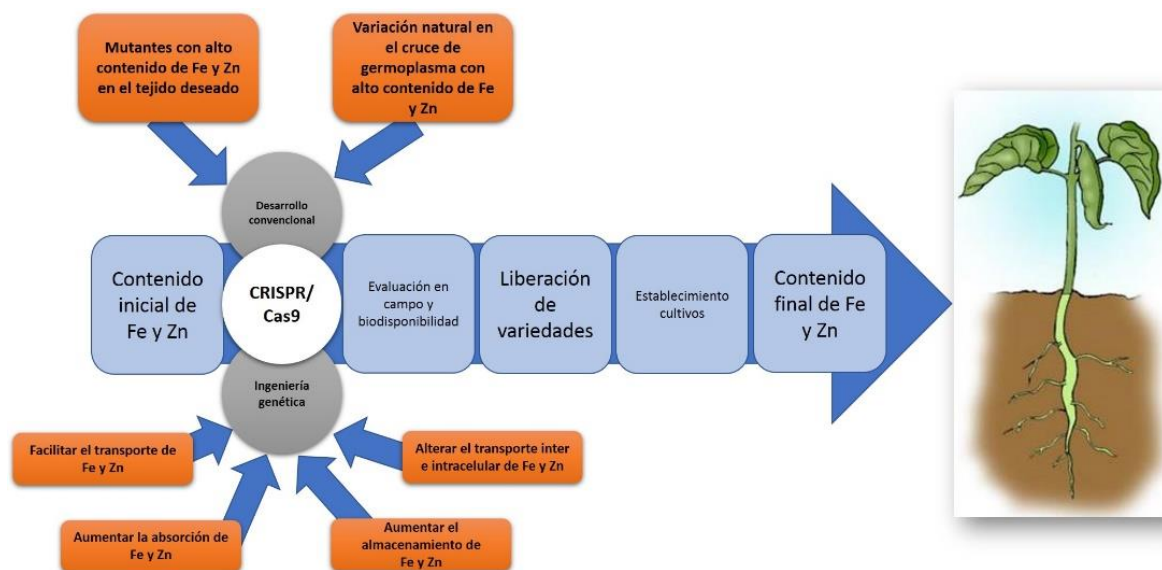


Figura 2. El uso de técnicas de edición genética en el proceso de biofortificación con Fe y Zn en frijol

Comprender la naturaleza de la acción de los genes y la herencia del contenido mineral de las semillas es crucial para desarrollar estrategias de mejoramiento efectivas para los micronutrientes (Cichy *et al.*, 2009). Se puede emplear CRISPR/Cas9 en la expresión incrementada de fitasas endógenas, para aumentar la bioaccesibilidad de Fe y Zn (Bohn *et al.*, 2008). En la figura 2 se muestran los métodos para la biofortificación con Fe y Zn en frijol común, destacando el uso de técnicas de edición genética.

6.7 CONCLUSIONES

Se estima que para el año 2050 seremos 9.700 millones de personas en el mundo; por lo tanto, la demanda de alimentos será mucho más alta que en la actualidad, lo que obligará a una producción más eficiente. Se calcula que dicha demanda aumentará entre un 59% y un 98% para 2050 (Valin *et al.*, 2014), lo cual hará necesario un replanteamiento de las prácticas agrícolas actuales. Una posible solución para mejorar la seguridad alimentaria y mejorar la calidad de los alimentos se relaciona con el uso de la ingeniería del genoma para crear nuevas variedades de cultivos. La ingeniería del genoma (o edición del genoma) generalmente se puede definir como la

modificación dirigida del ADN dentro de los organismos vivos. La agricultura actual enfrenta a desafíos importantes con relación al combate a la desnutrición por deficiencia de micronutrientes en la población mundial. Esto, debido al cambio climático y al rápido crecimiento de la población. Es un momento importante para la utilización de estas nuevas estrategias en el desarrollo de los cultivos, tales como la nanotecnología y el mejoramiento genético. La biotecnología ofrece oportunidades y herramientas para ser utilizadas en la producción de alimentos de mejor calidad nutricional. Los avances actuales en la biofortificación con leguminosas proporcionan las bases para futuras investigaciones con las nuevas y más recientes herramientas biotecnológicas.

6.8 BIBLIOGRAFÍA

- Aciksoz, S. B., Yazici, A., Ozturk, L., Cakmak, I.** 2011. Biofortification of wheat with iron through soil and foliar application of nitrogen and iron fertilizers. *Plant and Soil*, 349(1-2), 215-225.
- Alloway, B. J.** 2009. Soil factors associated with Zn deficiency in crops and humans. *Environmental Geochemistry and Health*, 31(5), 537-548.
- Alloway, B. J.** 2008. Zn in Soils and Crop Nutrition, second ed. IZA and IFA, Brussels, Belgium, Paris, France, 2008.
- Almendros, P., Obrador, A., Gonzalez, D., Alvarez, J. M.** 2015. Biofortification of Zn in onions (*Allium cepa* L.) and soil Zn status by the application of different organic Zn complexes. *Scientia Horticulturae* 186:254–265.
- Bashir, K., Nozoye, T., Ishimaru, Y., Nakanishi, H., Nishizawa, N. K.** 2013. Exploiting new tools for iron biofortification of rice. *Biotechnology advances*, 31(8), 1624-1633.
- Beebe, S., Gonzalez, A., Rengifo, J.** 2000. Research on trace minerals in the common bean. *Food and Nutrition Bulletin* 21, 387–391.
- Beebe, S.E., Rao, I.M., Blair, W.M., Acosta-Gallegos, J.A.** 2013. Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Frontiers in Physiology. Plant Physiology. Methods Article*. 4(35), 1-20.
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., Patron, N. J., Nekrasov, V.** 2015. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current opinion in biotechnology*, 32, 76-84.
- Blair, M. W.** 2013. Mineral biofortification strategies for food staples: the example of common bean. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(35), 8287-8294.
- Blair, M. W., Izquierdo, P.** 2012. Use of the advanced backcross-QTL method to transfer seed mineral accumulation nutrition traits from wild to Andean cultivated common beans. *Theoretical and applied genetics*, 125(5), 1015-1031.
- Blair, M. W., Monserrate, F., Beebe, S. E., Restrepo, J., Flores, J. O.** 2010. Registration of high mineral common bean germplasm lines NUA35 and NUA56 from the red-mottled seed class. *Journal of Plant Registrations*, 4(1), 55-59.
- Blair, M. W., Galeano, C. H., Tovar, E., Torres, M. C. M., Castrillón, A. V., Beebe, S. E., Rao, I. M.** 2012. Development of a Mesoamerican intragenepool genetic map for quantitative trait loci detection in a drought tolerant × susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cross. *Molecular Breeding*, 29(1), 71-88.
- Bohn, L., Meyer, A. S., Rasmussen, S. K.** 2008. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(3), 165-191.
- Boonchuay, P., Cakmak, I., Rerkasem, B., Prom-U-Thai, C.** 2013. Effect of different foliar Zn application at different growth stages on seed Zn concentration and its impact on seedling vigor in rice. *Soil science and plant nutrition*, 59(2), 180-188.
- Bouis, H.E., Welch, R.M.** 2010. Biofortification—a sustainable agricultural strategy for reducing micronutrient malnutrition in the global south. *CropScience*, 50 (Supplement_1), S-20.

- Broughton, W.J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., Vanderleyden, J.** 2003. Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. *Plant and soil* 252, 55-128.
- Cakmak, I.** 2008. Zn deficiency in wheat in Turkey. In *Micronutrient deficiencies in global crop production* (pp. 181-200). Springer, Dordrecht.
- Cakmak, I.** 2009. Enrichment of fertilizers with Zn: An excellent investment for humanity and crop production in India. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 23(4), 281-289.
- Campion, B., Glahn, R. P., Tava, A., Perrone, D., Doria, E., Sparvoli, F., Nielsen, E.** 2013. Genetic reduction of antinutrients in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed, increases nutrients and in vitro iron bioavailability without depressing main agronomic traits. *Field Crops Research*, 141, 27-37.
- Campion, B., Sparvoli, F., Doria, E., Tagliabue, G., Galasso, I., Fileppi, M., Nielsen, E.** 2009. Isolation and characterisation of an lpa (low phytic acid) mutant in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 118(6), 1211-1221.
- CIAT. International Center for Tropical Agriculture.** 2008. Annual report. Outcome line SBA-1. Improved beans for the developing world; p. 39–65.
- Cichy, K. A., Forster, S., Grafton, K. F., Hosfield, G. L.** 2005. Inheritance of seed Zn accumulation in navy bean. *Crop Sci.* 45, 864–870.
- Cichy, K. A., Caldas, G. V., Snapp, S. S., Blair, M. W.** 2009. QTL analysis of seed iron, Zn, and phosphorus levels in an Andean bean population. *Crop Sci.* 49, 1742–1750.
- Connorton, J.M., Jones, E.R., Rodriguez-Ramiro, I., Fairweather-Tait, S., Uauy, C. Balk, J.** 2017. Vacuolar Iron Transporter TaVIT2 transports Fe and Mn and is effective for biofortification. *Plant Physiology* 174, 2434–2444.
- Cichy, K.A., Forster, S., Grafton, K.F., Hosfield, G.L.** 2005. Inheritance of seed Zn accumulation in navy bean. *Crop Science* 45, 864–870.
- de Figueiredo, M. A., Boldrin, P. F., Hart, J. J., de Andrade, M. J., Guilherme, L. R., Glahn, R. P., Li, L.** 2017. Zn and selenium accumulation and their effect on iron bioavailability in common bean seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 111, 193-202.
- de Valença, A.W., Bake, A., Brouwer, I.D., Giller, K.E.** 2017. Agronomic biofortification of crops to fight hidden hunger in sub-Saharan Africa. *Glob Food Sec.* 12, 8–14.
- Deshpande, P., Dapkekar, A., Oak, M. D., Paknikar, K. M., Rajwade, J. M.** 2017. Zn complexed chitosan/TPP nanoparticles: A promising micronutrient nanocarrier suited for foliar application. *Carbohydrate polymers*, 165, 394-401.
- Dwivedi, S. L., Sahrawat, K. L., Rai, K. N., Blair, M. W., Andersson, M. S., Pfeiffer, W. H.** 2012. Nutritionally enhanced staple food crops. John Wiley & Sons, Inc..
- Farooq, M., Cheema, Z. A., Wahid, A.** 2012. Seed priming with boron improves growth and yield of fine grain aromatic rice. *Plant Growth Regulation*, 68(2), 189-201.
- Finkelstein, J. L., Haas, J. D., Mehta, S.** 2017. Iron-biofortified staple food crops for improving iron status: a review of the current evidence. *Current opinion in biotechnology*, 44, 138-145.
- Galeano, C.H., Cortés, A.J., Fernández, A.C., Soler, Á., Franco-Herrera, N.,**

- Makunde, G., Vanderleyden, J., Blair M.W.** 2012. Gene-Based Single Nucleotide Polymorphism Markers for Genetic and Association Mapping in Common Bean. *BMC Genetics*, 13(1),48.
- Galeano, C. H., Fernandez, A. C., Franco-Herrera, N., Cichy, K. A., McClean, P. E., Vanderleyden, J., Blair, M. W.** 2011. Saturation of an intra-gene pool linkage map: towards a unified consensus linkage map for fine mapping and synteny analysis in common bean. *PLoS One*, 6(12), e28135.
- Ghandilyan, A., Barboza, L., Tisné, S., Granier, C., Reymond, M., Koornneef, M., Schat, H., Aarts, M.G.M.**, 2009. Genetic analysis identifies quantitative trait loci controlling rosette mineral concentrations in *Arabidopsis thaliana* under drought. *New Phytol.* 184, 180–192.
- García-Bañuelos, M. L., Sida-Arreola, J. P., Sánchez, E.** 2014. Biofortification-promising approach to increasing the content of iron and Zn in staple food crops. *Journal of Elementology*, 19(3).
- Hawkesford, M.J., Zhao, F.J.** 2007. Strategies for increasing the selenium content of wheat. *J. Cereal Sci.* 46, 282–292.
- Hirschi, K.D.** 2009. Nutrient biofortification of food crops. *Annu. Rev. Nutr.* 29, 401–421.
- Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., Gerszberg, A., Wiktorek-Smagur, A., Kononowicz, A. K.** 2014. *Phaseolus vulgaris*—Recalcitrant potential. *Biotechnology advances*, 32(7), 1205–1215.
- Huber, K., Brigide, P., Bretas, E. B., Canniatti-Brazaca, S. G.** 2016. Phenolic acid, flavonoids and antioxidant activity of common brown beans (*Phaseolus vulgaris* L.) before and after cooking. *J. Nutr. Food Sci*, 6, 1-7.
- IFPRI (International Food Policy Research Institute).** 2016. Global Nutrition Report 2016: From Promise To Impact: Ending Malnutrition by 2030.
- Khoshgoftarmanesh, A.H., Schulin, R., Chaney, R.L., Daneshbakhsh, B., Afyuni, M.** 2010. Micronutrient-efficient genotypes for crop yield and nutritional quality in sustainable agriculture. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 30, 83–107.
- Li, S., Wang, J., Yu, Y., Wang, F., Dong, J., Huang, R.** 2016. D27E mutation of VTC1 impairs the interaction with CSN5B and enhances ascorbic acid biosynthesis and seedling growth in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*, 92(4-5), 473-482.
- Liu, R., Lal, R.** 2015. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of the total environment*, 514, 131-139.
- Ma, X., Zhu, Q., Chen, Y., Liu, Y. G.** 2016. CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications. *Molecular plant*, 9(7), 961-974.
- Macz-Pop, G. A., Rivas-Gonzalo, J. C., Pérez-Alonso, J. J., González-Paramás, A. M.** 2006. Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 94, 448–456.
- Malnoy, M., Viola, R., Jung, M. H., Koo, O. J., Kim, S., Kim, J. S., Nagamangala Kanchiswamy, C.** 2016. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Frontiers in plant science*, 7, 1904.

- Marles, R. J.** 2017. Mineral nutrient composition of vegetables, fruits and grains: The context of reports of apparent historical declines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 56, 93-103.
- Mayer, J. E., Pfeiffer, W. H., Beyer, P.** 2008. Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. *Current opinion in plant biology*, 11(2), 166-170.
- Medina-Velo, I. A., Zuverza-Mena, N., Tan, W., Hernandez-Viezcas, J. A., Peralta-Videoa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L.** 2016. Biophysical Methods of Detection and Quantification of Uptake, Translocation, and Accumulation of Nanoparticles. In *Plant Nanotechnology* (pp. 29-63). Springer, Cham.
- Molina, M. G., Quiroz, C. M., de la Cruz Lázaro, E., Martínez, J. R. V., Parra, J. M. S., Carrillo, M. G., Vidal, J. A. O.** 2016. Biofortificación de frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) con Fe y Zn. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, (17), 3427-3438.
- Moloto, R.M., Lengwati, M.D., Soundy, P., Dakora, F.D., Maseko, S.T.** 2018. Effect of soil type and biostimulants on growth parameters of chickpea. Paper presented at the South African association of botanists; Pretoria: University of Pretoria.
- Montalvo, D., Degryse, F., Da Silva, R. C., Baird, R., McLaughlin, M. J.** 2016. Agronomic effectiveness of Zn sources as micronutrient fertilizer. In *Advances in Agronomy* (Vol. 139, pp. 215-267). Academic Press.
- Mudryj, A.N., Yu, N., Aukema, H.M.** 2014. Nutritional and health benefits of pulses. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 39, 1197-1204.
- Mumtaz, M.Z., Ahmad, M., Jamil, M., Hussain, T.** 2017. Zn solubilizing *Bacillus* spp. Potential candidates for biofortification in maize. *Micr Res.* 202, 51-60.
- Noulas, C., Tziouvalekas, M., Karyotis, T.** 2018. Zn in soils, water and food crops. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*.
- OMS,** Global Health Risks, Mortality and Burden of Disease Attributable to Selected Major Risk, Available at http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks, 2009 (revisado el 20.07.2018).
- Palchoudhury, S., Jungjohann, K. L., Weerasena, L., Arabshahi, A., Gharge, U., Albattah, A., Holler, R. A.** 2018. Enhanced legume root growth with pre-soaking in α -Fe₂O₃ nanoparticle fertilizer. *RSC Advances*, 8(43), 24075-24083.
- Palmgren, M.G., Clemens, S., Williams, L.E., Kramer, U., Borg, S., Schjorring, J.K., Sanders, D.,** 2008. Zn biofortification of cereals: problems and solutions. *Trends Plant Sci.* 13, 464-473.
- Petry, N., Boy, E., Wirth, J. P., Hurrell, R. F.** 2015. The potential of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) as a vehicle for iron biofortification. *Nutrients*, 7(2), 1144-1173.
- Pfeiffer, W. H., McClafferty, B.** 2007. HarvestPlus: breeding crops for better nutrition. *CropScience*, 47(Supplement_3), S-88.
- Pinheiro, C., Baeta, J. P., Pereira, A. M., Domingues, H., Ricardo, C. P.** 2010. Diversity of seed mineral composition of *Phaseolus vulgaris* L. germplasm. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(4), 319-325.

- Raliya, R., Franke, C., Chavalmane, S., Nair, R., Reed, N., Biswas, P.** 2016. Quantitative understanding of nanoparticle uptake in watermelon plants. *Frontiers in plant science*, 7, 1288.
- Ram, H., Rashid, A., Zhang, W., Duarte, A. P., Phattarakul, N., Simunji, S., Mahmood, K.** 2016. Biofortification of wheat, rice and common bean by applying foliar Zn fertilizer along with pesticides in seven countries. *Plant and soil*, 403(1-2), 389-401.
- Rui, M., Ma, C., Hao, Y., Guo, J., Rui, Y., Tang, X., Zhu, S.** 2016. Iron oxide nanoparticles as a potential iron fertilizer for peanut (*Arachis hypogaea*). *Frontiers in plant science*, 7, 815.
- Sadeghzadeh, B.** 2013. A review of Zn nutrition and plant breeding. *Journal of soil science and plant nutrition*, 13(4), 905-927.
- Saltzman, A., Birol, E., Bouis, H. E., Boy, E., De Moura, F. F., Islam, Y., & Pfeiffer, W. H.** 2013. Biofortification: progress toward a more nourishing future. *Global Food Security*, 2(1), 9-17.
- Sánchez, E., Sida-Arreola, J. P., Ávila-Quezada, G. D., Ojeda-Barrios, D. L., Flores-Córdova, M. A., Preciado-Rangel, P., Márquez-Quiroz, C.** 2017. Can biofortification of Zn improve the antioxidant capacity and nutritional quality of beans?. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 237-241.
- Sands, D.C., Morris, C.E., Dratz, E.A., Pilgeram, A.L.,** 2009. Elevating optimal human nutrition to a central goal of plant breeding and production of plant-based foods. *Plant Science* 177, 377-389.
- Sharma, P., Aggarwal, P., Kaur, A.** 2017. Biofortification: A new approach to eradicate hidden hunger. *Food Reviews International*, 33(1), 1-21.
- Shehu, H.E., Jamala, G.Y.** 2010. Available Zn distribution, response and uptake of rice (*Oriza sativa*) to applied zn along a topose quence of lake gerio fadama soils at Yola, North-eastern Nigeria. *J. Am. Sci.* 6, 1013-1016.
- Shivay, Y. S., Prasad, R., Kaur, R., & Pal, M.** 2016. Relative efficiency of Zn sulphate and chelated Zn on Zn biofortification of rice grains and Zn use-efficiency in Basmati rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 86(4), 973-984.
- Sperotto, R. A., Ricachenevsky, F. K.** 2017. Common Bean Fe Biofortification Using Model Species' Lessons. *Frontiers in plant science*, 8, 2187.
- Thompson, B., Cohen, M. J.** 2015. Increased concentrations of atmospheric carbon dioxide and Zn deficiency. *The Lancet Global Health*, 3(10), e585-e586.
- Thonar, C., Lekfeldt, J. D. S., Cozzolino, V., Kundel, D., Kulhánek, M., Mosimann, C., Walder, F.** 2017. Potential of three microbial bio-effectors to promote maize growth and nutrient acquisition from alternative phosphorous fertilizers in contrasting soils. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1), 7.
- Valin, H., Sands, R. D., van der Mensbrugghe, D., Nelson, G. C., Ahammad, H., Blanc, E., Heyhoe, E.** 2014. The future of food demand: understanding differences in global economic models. *Agricultural Economics*, 45(1), 51-67.
- Velu, G., Kulkarni, V.N., Rai, K.N., Muralidharan, V., Longvah, T., Sahrawat, K.L., Raveendran, T.S.**

2006. A rapid method for screening grain iron content in pearl millet. *Int. Sorghum Millets News*, 47, 158e161.
- Vinoth, A., Ravindhran, R.** 2017. Biofortification in millets: a sustainable approach for nutritional security. *Frontiers in plant science*, 8, 29.
- White, P.J.**, 2016. Selenium accumulation by plants. *Ann. Bot.* 117, 217-235.
- Wolt, J. D., Wang, K., Yang, B.** 2016. The regulatory status of genome-edited crops. *Plant biotechnology journal*, 14(2), 510-518.
- Zou, C. Q., Zhang, Y. Q., Rashid, A., Ram, H., Savasli, E., Arisoy, R. Z., Hassan, M.** 2012. Biofortification of wheat with Zn through Zn fertilization in seven countries. *Plant and Soil*, 361(1-2), 119-130.

Biofortificación con Selenio en Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)



Hermosillo Cereceres, Martha Aracely; Romero Monreal, Luis; Sánchez Chávez, Esteban.

7.1 Resumen	123
7.2 Introducción	123
7.3 Biofortificación con micronutrientes de cultivos agrícolas	124
7.4 Biofortificación con Se e inducción de la capacidad antioxidante	130
7.5 Selenio en la calidad nutricional de los cultivos	136
7.6 Influencia del Selenio sobre el metabolismo nitrogenado de las plantas	137
7.7 Selenio en la nutrición y la salud humana	137
7.8 Consideraciones finales	139
7.9 Bibliografía	140

7

Biofortificación con Selenio en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Hermosillo Cereceres, Martha Aracely; Romero Monreal, Luis; Sánchez Chávez, Esteban.

7.1 RESUMEN

La deficiencia de selenio en el mundo es un problema actual de salud pública, por lo que la estrategia de biofortificación de cultivos es una herramienta útil para dar solución a tan grave situación. Actualmente, se han realizado investigaciones en diferentes cultivos para conocer el efecto del selenio (Se) en diferentes aspectos, sin embargo, poco es lo que se ha investigado en el cultivo de frijol. La presente revisión de literatura tiene el objetivo de conocer el estado actual del proceso de biofortificación con selenio en frijol, así como, dar a conocer áreas de oportunidad para investigar.

7.2 INTRODUCCIÓN

La biofortificación de cultivos agrícolas con micronutrientes es el proceso mediante el cual se incrementa el contenido de elementos esenciales en la parte comestible de la planta mediante la fertilización tradicional o con técnicas de biotecnología, para el beneficio del ser humano. La técnica utilizada más eficiente y con mejores resultados es la fertilización tradicional, ya que a un bajo costo se han obtenido excelentes resultados y se ha beneficiado a importantes sectores de la población. Uno de los organismos que ha trabajado bajo este concepto de biofortificación de cultivos es Harvest Plus, y mencionan que esta técnica es factible y además puede tener un impacto biológico, sin comprometer las características agronómicas del cultivo. Sin embargo, el reto es lograr que los consumidores acepten cultivos biofortificados, pero con el desarrollo de mercados y la creación de demanda, esto puede convertirse en una realidad.

Entre los nutrientes que se han utilizado recientemente en programas de biofortificación destaca el selenio (Se), debido a su importancia para la salud humana. Estudios recientes indican

que bajo una adecuada ingesta de este nutriente se puede prevenir diferentes tipos de cáncer, además tiene influencia sobre el buen funcionamiento del sistema inmunológico. Sin embargo, actualmente existe una deficiencia del consumo de Se afectando a gran parte de la población mundial, esto es debido a que los suelos contienen poca cantidad del elemento o que no está disponible para las plantas y debido a que la fuente principal de este nutriente es mediante el consumo de vegetales el problema está latente. El contenido de Se en las plantas depende de la forma química aplicada y además de la capacidad que tenga la planta para tolerarlo en sus tejidos sin llegar a presentar síntomas de toxicidad, ya que el Se en grandes cantidades puede actuar como prooxidante. En base al contenido de Se que toleran las plantas sin presentar síntomas de toxicidad se clasifican en hiperacumuladoras, acumuladoras y no acumuladoras.

Las plantas pueden absorber el Se del suelo principalmente como selenato o selenito, no obstante, pocos trabajos son los que han evaluado las dos fuentes de Se y sus efectos en un mismo cultivo. Además, se debe tener en cuenta también el patrón de distribución del Se en cada cultivo ya que bajo el concepto de biofortificación el propósito es que el nutriente se concentre en la parte comestible. Por lo que, es necesario detallar lo más posible el efecto de dicho nutriente en todas las funciones del cultivo en particular, ya que el Se aún no es considerado esencial para las plantas. El presente trabajo de tesis describe la biofortificación con Se (selenato y selenito) y su influencia en la capacidad antioxidante y calidad nutricional del frijol.

7.3 BIOFORTIFICACIÓN CON MICRONUTRIENTES DE CULTIVOS AGRÍCOLAS

La deficiencia de micronutrientes como hierro (Fe), zinc (Zn), selenio (Se) y el yodo (I) es un problema de salud pública, que afecta a más de un tercio de la población mundial (Who, 2002). El número de personas que tienen deficiencia en la ingesta de Se se estima entre 0.5 y 1 millón de personas en todo el mundo (Combs, 2001). Deficiencias en calcio (Ca), magnesio (Mg) y cobre (Cu) se presentan en un tercio de la población principalmente en los países en vías de desarrollo (White y Broadley, 2005; Who, 2006). La malnutrición por deficiencia de micronutrientes tiene grandes consecuencias socio-económicas, lo que resulta en el aumento de la mortalidad, el poco crecimiento, poco desarrollo y baja capacidad de aprendizaje en los bebés y niños, además de pérdida de la capacidad para trabajar de los adultos, lo cual a su vez debilita el crecimiento económico e induce pobreza (Banco Mundial, 2006; Who, 2002). Lo anterior ha sido ocasionado en parte por la agricultura moderna que impulsa principalmente un mayor rendimiento a menor costo, pero sin darle importancia a la calidad nutricional (Sands *et al.*, 2009).

La biofortificación con micronutrientes de los cultivos básicos se presenta como una herramienta útil para combatir esta problemática. Esta alternativa busca incrementar el contenido de nutrientes en los cultivos mediante técnicas de fertilización, fitomejoramiento tradicional o fitomejoramiento asistido con biotecnología (Bouis, 1996; Welch y Graham, 1999; Welch, 2002; Welch and Graham, 2004; Nestel *et al.*, 2006; Johns y Eyzaguirre, 2007).

La biofortificación tiene múltiples ventajas, como la inversión una sola vez para desarrollar

semillas fortificadas, los costos recurrentes son bajos y el germoplasma puede ser compartido. Además, el sistema de cultivos biofortificados es un medio viable para hacer llegar alimentos fortificados a las personas con acceso limitado a ellos, especialmente a gente la desnutrida de zonas rurales relativamente remotas (Nestel *et al.*, 2006). Sin embargo, requiere que la investigación agrícola tenga vínculos directos con los sectores de salud humana y nutrición humana (Bouis *et al.*, 2003).

Por lo anterior, tres puntos principales son los que se requieren para implementar un programa de biofortificación con éxito: 1) que los cultivos biofortificados deben ser de alto rendimiento y rentable para el agricultor; 2) los cultivos biofortificados deben mostrar eficacia para disminuir la problemática de malnutrición en los seres humanos; 3) el cultivo biofortificado debe ser aceptado por los agricultores y los consumidores en la región de destino. La organización Harvest Plus, que es no gubernamental y se enfoca en el desarrollo de cultivos biofortificados con selenio ha abordado todos estos temas (Hotz *et al.*, 2007). Un punto importante a tomar en cuenta para la optimización de los programas de biofortificación es el procesamiento que se le da a los cultivos después de la cosecha, ya que cultivos como el trigo se consumen después de un proceso de molienda (White and Broadley 2005) lo que pudiera modificar las concentraciones biodisponibles de los nutrientes en el cultivo. Además, las concentraciones de algunos nutrientes como el Se y el S se encuentran en mayor proporción en el embrión de la semilla, otros como el Fe, Cu y Zn se encuentran principalmente en el salvado (Gregorio *et al.*, 2000; Lyons *et al.*, 2005).

7.3.1 Biofortificación con selenio

El contenido de Se en los alimentos es generalmente determinado por la cantidad

biodisponible de Se en los suelos. La concentración de Se en la mayoría de los suelos del mundo es baja (0.01-2.0 mg Se kg⁻¹), con un promedio de 0.4 mg Se kg⁻¹; sin embargo, existen suelos seleníferos con concentraciones mayores a 1200 mg Se kg⁻¹ (Fordyce, 2005).

Para mejorar la problemática de la deficiencia de Se en la población mundial, lo necesario es biofortificar cultivos básicos en la dieta humana, como el trigo, maíz, arroz, frijol y papa. Las concentraciones de Se en estos cultivos se puede aumentar a través de la fertilización tradicional (Eurola *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2002; Gupta and Gupta 2002; Lyons *et al.*, 2004; 2005; Turakainen *et al.*, 2004). Teniendo beneficios como lo indican Pennan *et al.* (2002) y Hu *et al.* (2003), que encontraron que el Se incrementa el crecimiento en el cultivo de la lechuga y el te verde respectivamente. También se ha encontrado que el Se incrementa el crecimiento y la calidad del tubérculo de papa (Turakainen *et al.*, 2007). En zacate ryegrass se ha demostrado que promueve el crecimiento de las raíces (Cartes *et al.*, 2010).

La adición de Se en plantas de fresa ayudó a disminuir el estrés ocasionado por los rayos UV-B, además hubo un mayor crecimiento (Heijari, 2006). En plantas hiperacumuladoras como la *Brassica juncea* el Se las protege contra el ataque de herbívoros y de hongos (Hanson *et al.*, 2003).

En lo referente a la adición de Se al cultivo de frijol, son pocos los trabajos que se han realizado. Arvy (1989) indica que después de la absorción por tres horas de Se en forma de selenito por la raíz de las plantas de frijol, este es eficientemente trasladado a la parte aérea, encontrando además que la captación se incrementa cuando las plantas se mantienen en obscuridad o cuando la solución nutritiva se suministró con glucosa, por lo que indica que la

translocación del selenito es mediante un transporte activo.

Posteriormente Arvy, (1993), aplicó selenato y selenito reportando lo siguiente: después de 3 horas de absorción de selenato más del 50% se transmitió a los órganos aéreos. Cuando las raíces se sumergen en una solución de hidroxilamina el nivel de Se se redujo en un 80% en toda la planta, lo que sugiere que la absorción de selenato requiere energía. Respecto al selenito una parte importante del Se se había acumulado en las raíces, mientras que una pequeña fracción se trasmite a los órganos aéreos. Este porcentaje se redujo en 20% cuando las plantas se transfirieron a una solución de hidroxilamina, lo que sugiere que parte del selenito entro a las raíces en forma pasiva.

Smrkolj *et al.* (2007) aplicaron selenato en plantas de frijol bajo dos métodos diferentes (fertilización foliar y fertilización vía hidropónica) durante 10 días, encontrando que en las semillas obtenidas de la fertilización foliar se acumuló mas Se (2 µg g⁻¹ p.s. contra 0.6 µg g⁻¹ p.s.). Además, encontraron SeMeSeCis y Semet y dos especies desconocidas de Se.

En un estudio reciente en frijol Aggarwal *et al.* (2011) aplicaron selenato hasta los diez días de edad de las plántulas. Encontrando que en bajas dosis (1 y 2 ppm) el selenato incremento el crecimiento de los rebrotes y raíces, mientras que en dosis altas (4 y 6 ppm) el crecimiento se vio inhibido, lo que se relacionó al daño en la membrana, baja respiración celular, disminución en el contenido de clorofila y agua en las hojas. Además, indican que el efecto fitotóxico del Se podría ser debido a la reducción de los niveles endógenos de prolina y el aumento en el estrés oxidativo.

7.3.2 Estrategias de biofortificación con selenio

La concentración de Se en los tejidos vegetales puede ser aumentada mediante la fertilización en el suelo o aplicaciones foliares. El mejor ejemplo de la eficacia de esta técnica para incrementar el contenido de Se en los cultivos es Finlandia (en donde desde 1984 se ha incluido Se en los fertilizantes) y Nueva Zelanda (Varo *et al.*, 1994; Euroola *et al.*, 1989; 1991; 2004; Lyons *et al.*, 2003; Hartikainen 2005), lo anterior ha ayudado a incrementar la ingesta diaria de Se en la población de ese país de 25 a 60 μg en 1974 a un promedio de 90 μg en 1992 (Reilly, 1998).

La aplicación de Se vía fertilización foliar en pasto y forrajes ha sido aplicada con éxito, mostrando resultados favorables en el contenido de Se en la dieta de animales y humanos (Gissel-Nielsen 1998; Gupta y Gupta 2002; Broadley *et al.*, 2006).

Respecto al mejoramiento genético para aumentar el contenido de Se, se menciona que la variabilidad genética hereditaria no es lo suficientemente eficiente para acumular Se en los cultivos (Graham *et al.*, 2001; Rayman, 2002; Lyons *et al.*, 2003; 2005).

El uso de la biotecnología mediante la manipulación de genes puede ser otra alternativa para incrementar el contenido de Se en las plantas. Bañuelos *et al.* (2005) menciona que la sobreexpresión de la enzima ATP sulfurilasa y de genes involucrados en la síntesis del glutatión aumenta la acumulación de Se en plantas transgénicas de mostaza de indias (*Brassica juncea* L.). En plantas de *Arabidopsis*, la sobreexpresión de la enzima selenocisteína liasa incrementa la tolerancia al Se y aumenta en un 50% la acumulación (Hoewyk *et al.*, 2005).

7.3.3 Química del selenio

El Se y el azufre (S) son nutrientes con productos químicos muy similares, por lo que su

absorción y asimilación en las plantas es a través de vías comunes (Eapen y D'Souza, 2005). Las valencias más comunes del Se son -2, 0, +2, +4, +6, que se presentan como Se^{2-} (selenuro), Se^0 (selenio elemental), $\text{Se}_2\text{O}_3^{2-}$ (tioselenato), SeO_3^{2-} (selenito) y SeO_4^{2-} (selenato) (Sors *et al.*, 2005). La acumulación de Se y su vía metabólica no solo depende de la especie de planta, sino también de la forma química suministrada (Li *et al.*, 2008; Ximenex Embun *et al.*, 2004; Zayed *et al.*, 1998).

El Se es muy móvil en condiciones oxidantes, pero su movilidad disminuye con la disminución del pH (Terry *et al.*, 2005; Broadley *et al.*, 2006). Además, la termodinámica y las condiciones redox pueden cambiar las distribuciones de equilibrio entre las diferentes formas de Se (**Figura 1**), no obstante, en el medio ambiente estas condiciones y sus cambios dependen de la cinética de las reacciones. De la misma forma, las formas orgánicas de Se también son abundantes en el medio ambiente y son sensibles al pH y condiciones redox de su entorno. No obstante, la distribución geológica, química y bioquímica del Se, tiende a ser análogas al S (Ralston *et al.*, 2008). Un conocimiento a fondo de la estructura química del Se es de vital importancia para un mayor beneficio en sistemas de producción. Sin embargo, la caracterización de las formas de Se más comúnmente usadas en la agricultura (selenato y selenito de sodio) es escasa (Barraza-Jimenez *et al.*, 2011).

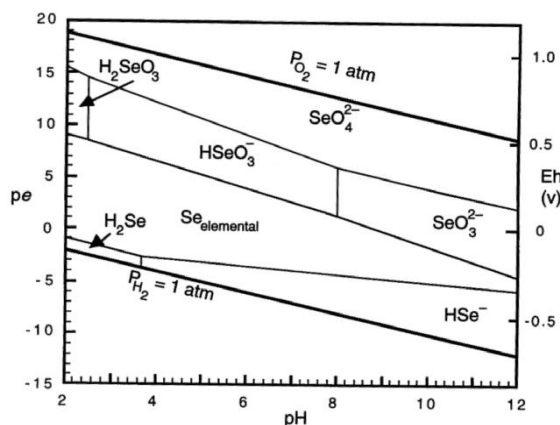


Figura 1 • Estabilidad termodinámica de las formas del Selenio en relación al potencial redox y pH (Drever, 1997).

7.3.4 Selenio en los suelos

El Se es uno de los elementos que se encuentran en mayor cantidad en la corteza terrestre, en gran parte se encuentra asociado con el azufre (S). Se estima que en la corteza terrestre hay entre 0.05 y 0.09 mg kg⁻¹ de Se. Sin embargo, la distribución geográfica de este elemento en los suelos es muy variada (Wang y Gao, 2001). Igualmente, la proporción de Se soluble en agua y biodisponible para las plantas no necesariamente se correlaciona con el nivel de Se total en el suelo (Zhao *et al.*, 1993). La concentración y forma presente del Se en los suelos está determinada principalmente por su geoquímica (White *et al.*, 2007; Rayman, 2008). Los factores que intervienen en la movilidad del Se en los suelos son el pH, condiciones redox y el contenido de materia orgánica. Un aumento en el pH del suelo aumenta la absorción de Se por la planta (Johnson, 1991).

Las formas más comúnmente aplicadas de Se son el selenito y el selenato, sin embargo, estudios recientes indican que menos del 20% del Se aplicado en el suelo en forma de selenato es absorbido por el cultivo (Keskinen *et al.*, 2009).

En México, en la zona norte, existen suelos con concentraciones altas de este elemento (Reilly, 2006). Sin embargo, el Altiplano mexicano es

una zona deficiente de Se (Ramírez-Bribiesca *et al.*, 2001), donde se localiza el estado de Zacatecas, la principal zona productora de frijol. Debido a que existe una insuficiencia de Se en los suelos, probablemente exista una deficiencia en el consumo de Se en la dieta mexicana, ya que actualmente el promedio de consumo diario de Se es de 40 µg (Becvort *et al.*, 2010), y el aporte a través del consumo de frijol es de 180 µg kg⁻¹, que resulta insuficiente para cubrir el requerimiento diario (Wyatt *et al.*, 1996).

7.3.5 Ruta de asimilación del selenio en plantas

Las plantas pueden tomar el Se como selenato, selenito, o como compuestos orgánicos de Se como selenocisteína (SeCis) y selenometionina (SeMet) (White *et al.*, 2004; White *et al.*, 2007). El selenito y el selenato son las dos formas químicas más comunes presentes en el ambiente. El selenito tiene más afinidad de adsorción y el selenato es más soluble en agua (Hamilton, 2003), ambas formas son fácilmente absorbidas por las plantas (Shardendu *et al.*, 2003; Bañuelos y Lin 2005).

En la **Figura 2** se esquematiza el proceso de asimilación del Se. El Se puede entrar como selenato en las células de la raíz a través de los transportadores de sulfato en la membrana plasmática (Terry *et al.*, 2000; White *et al.*, 2004) o como selenito. La absorción del selenito aún no está claramente evidenciada, sin embargo, se sugiere que la absorción de selenito es un proceso activo parcialmente mediado por los transportadores de fosfato (Li *et al.*, 2008). Después de que el selenato es absorbido por las plantas es transportado a los plástidos o puede permanecer en el citoplasma, donde es asimilado por la vía de asimilación del S. En esta ruta de asimilación el selenato es activado por la ATP sulfurilasa para formar Adenosin 5'fosfoselenato, que se reduce a selenito en la presencia de Adenosin 5'fosfosulfato reductasa y

posteriormente a seleniuro a través de una vía no enzimática en la presencia de glutatión. El seleniuro se asimila en SeCis y SeMet. Estos seleno aminoácidos se incorporan a las proteínas de forma no específica y pueden causar toxicidad a la planta. Los selenoaminoácidos también pueden ser eliminados mediante la volatilización al convertirse en dimetilseleniuro (DMSe) (Lu *et al.*, 1995; Ip *et al.*, 2002; Ellis y Salt, 2003), siendo el principal producto de la fitovolatilización (Dumont *et al.*, 2006), mediante la enzima sulfato metil metionina hidrolasa que convierte la selenometilmetionina a DMSe (Turakainen, 2007; Berken *et al.*, 2002). En las plantas acumuladoras, la SeCis es metilada y se convierte en dimetildiseleniuro para ser volatilizado (Terry *et al.*, 2000).

La habilidad de las plantas para volatilizar el Se está influenciada por la concentración de Se en el medio de cultivo, la especie de Se suministrada y la concentración de sulfato en

comparación al selenato (Terry *et al.*, 2000). La tasa de volatilización de Se varía considerablemente entre las especies de plantas (Duckart *et al.*, 1992). Sin embargo, para algunas especies no existe diferencia entre la tasa de volatilización de Se cuando se suministra selenito o selenato como es el caso de los árboles de sauces (*Salix atsudana* Koidz \times *alba* L. y *Salix babylonica* L.) (Yu y Gu, 2008). Mientras que en cultivos como el brócoli, mostaza de India, remolacha azucarera y arroz, se volatiliza más selenito que selenato (Zayed *et al.*, 1998). Respecto a la absorción Yu y Gu (2008) reportaron que en los árboles de sauces (*Salix atsudana* Koidz \times *alba* L. y *Salix babylonica* L.) se absorbió más rápidamente el selenato que el selenito, sin embargo, indican que aunque el selenato fue más eficientemente absorbido por la planta, el selenito tubo mayor movilidad en su interior.

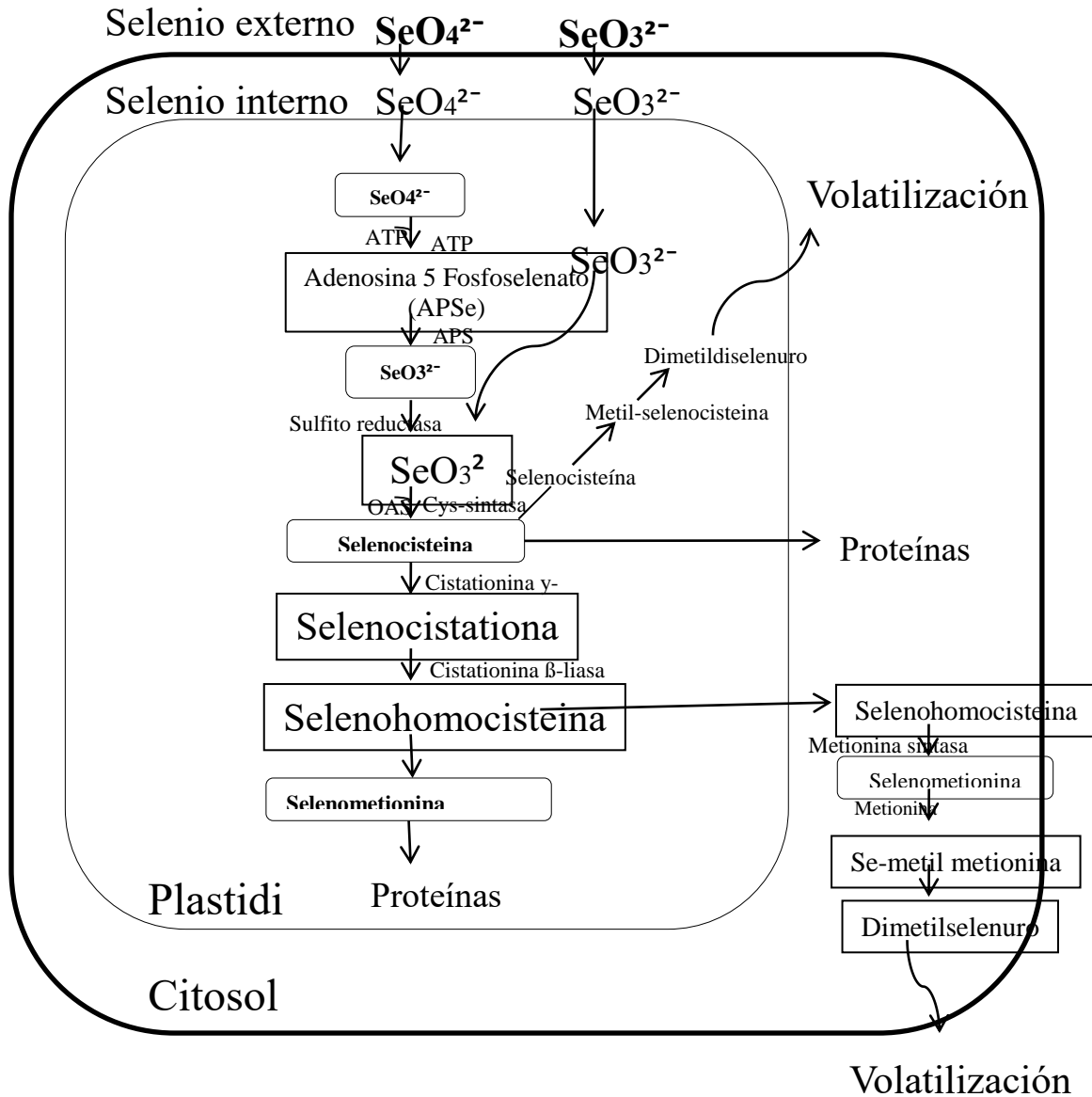


Figura 2 • Esquema simplificado de la ruta de asimilación y eliminación del Se en plantas (Terry et al., 2000; Sors et al., 2005).

La respuesta de las plantas al Se puede variar dependiendo de la concentración del nutriente en el suelo y de su concentración. En general, las plantas se pueden dividir en tres grupos: no acumuladoras de Se, indicadoras de Se, y acumuladoras de Se. Las plantas no acumuladoras rara vez contienen más de 100 µg Se g⁻¹ de materia seca, las indicadoras pueden contener hasta 1,000 µg Se g⁻¹ de materia seca, mientras que las acumuladoras pueden contener hasta 4,000 µg Se g⁻¹ de materia seca, cuando

crecen en suelos ricos en Se, por ejemplo, en áreas del oeste de Estados Unidos (Bell *et al.*, 1992; Feist y Parker, 2001). Las especies de plantas con capacidad para tolerar grandes cantidades de Se son usadas para fitorremediación en lugares contaminados con Se (Terry *et al.*, 2000; Berken *et al.*, 2002). Sin embargo, la mayoría de las plantas cultivadas tienen una baja tolerancia a altas concentraciones de Se. Generalmente, las plantas solo contienen bajos niveles como 25

$\mu\text{mol Se g}^{-1}$ y son consideradas como no acumuladoras (Hasanuzzaman *et al.*, 2010). En plantas acumuladoras de Se, la selenocisteína puede ser metilada y convertida a dimetilseleniuro. La metilselenocisteína no es incorporada a las proteínas y puede ser volatilizada como dimetilseleniuro, lo que es un paso importante para evitar la toxicidad de Se (Sors *et al.*, 2005).

Cuando se suministra selenato a las plantas no hiperacumuladoras, acumulan Se principalmente como selenato, y sólo una pequeña fracción (aproximadamente 5%) como Se orgánico (C-Se-C) (De Souza *et al.*, 1998) y los más altos niveles de Se se encuentran en los tejidos vasculares (Freeman *et al.*, 2006). En plantas hiperacumuladoras se acumula Se principalmente como metilSeCis en las hojas o en las vacuolas de las células epidérmicas (Freeman *et al.*, 2006). Por lo tanto, el metabolismo y el patrón de distribución es diferente entre las plantas no hiperacumuladoras y las acumuladoras. Se cree que el Se es distribuido dentro de la planta como selenato y/o como compuestos orgánicos a través del floema (White *et al.*, 2007).

La toxicidad de Se es originada primeramente por la generación de radicales superóxido, la sustitución del Se por el S en las proteínas (sustitución de la cisteína y metionina por selenoanálogos) y por la inhibición de la metilación, lo que significa que actúa como pro oxidante (Zayed *et al.*, 199; Terry *et al.*, 2000; Spallholz y Hoffman, 2002). La absorción de altas concentraciones de Se por la raíz de las plantas provoca síntomas de lesiones como retraso en el crecimiento, clorosis, marchitez y secado de las hojas, disminución de la síntesis de proteínas, lo que origina estrés oxidativo y lleva a la muerte prematura de la planta (Mengel y Kirkby, 1987).

7.4 BIOFORTIFICACIÓN CON Se E INDUCCIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los antioxidantes son sustancias orgánicas que cuando están presentes en bajas concentraciones en comparación con las de un sustrato oxidable, retrasa significativamente o previene la oxidación de ese sustrato (Halliwell y Gutteridge, 1999). Entre los compuestos con capacidad antioxidante destacan los compuestos fenólicos, carotenoides, ascorbato, glutatión y Se (Shao *et al.*, 2008).

7.4.1 Compuestos fenólicos

El grupo de los compuestos fenólicos comprende aproximadamente 8,000 compuestos presentes en la naturaleza. Estos tienen una estructura común: un anillo fenol, que es un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo (**Figura 3**).

Los compuestos fenólicos tienen efectos benéficos en la salud, principalmente mediante la actividad antioxidante (Fang *et al.*, 2002). Estos compuestos remueven los radicales libres, además secuestran metales, activan enzimas antioxidantes y pueden inhibir oxidasas (Heim *et al.*, 2002).

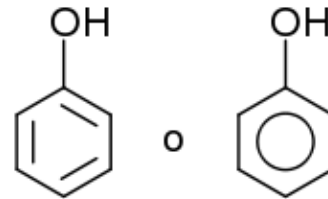


Figura 3 • Estructura básica de un fenol.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios en las plantas, derivados de la fenilalanina. Las plantas y los alimentos contienen una gran variedad de derivados fenólicos, incluyendo fenoles simples,

fenilpropanoides, derivados del ácido benzoico, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanos y ligninas, suberina y cutina. Los compuestos fenólicos son esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, actúan como antipatógenos, contribuyen a la pigmentación, y son atrayentes de polinizadores. Además, pueden proteger a las plantas de la luz UV y son antioxidantes naturales. Estos compuestos presentan actividad antimutagénica y anticancerígena y juegan un papel muy importante en la salud debido a que se han asociado con la reducción de enfermedades crónico-degenerativas (Rui Hai, 2004).

7.4.2 Flavonoides

Los flavonoides son parte de los polifenoles y poseen al menos 2 subunidades fenólicas (**Figura 4**). Los compuestos que tienen 3 ó más subunidades fenólicas se denominan taninos (Robbins, 2003).

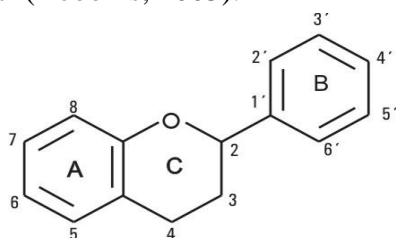


Figura 4 • Estructura básica de los flavonoides

Los flavonoides comprenden alrededor de 4,000 compuestos y son derivados fenólicos. Estos poseen actividad antioxidante y capacidad para capturar radicales libres (Vinson *et al.*, 1995). La actividad antioxidante depende de la estructura individual y del número de hidroxilos sustituyentes, así como, del peso molecular. En los flavonoides, esta característica se asocia con la presencia en la molécula de grupos orto dihidroxi en el anillo B, un doble enlace entre el C₂ y C₃ en conjunto con la posición 4-oxo en el anillo C, y grupos 3-5 hidroxilo, y la función 4 – oxo en los anillos A y C (Velioglu *et al.*, 1998).

7.4.3 Principales compuestos fenólicos de la semilla del frijol

La semilla de frijol contiene diferentes compuestos fenólicos, principalmente se encuentran en la cascarilla y el color de ésta se encuentra determinado por la presencia y concentración de polifenoles tales como flavonoides glicosilados, taninos condensados y antocianinas (Choung *et al.*, 2003; Romani *et al.*, 2004; Salinas-Moreno *et al.*, 2005).

Los taninos son producto de la condensación de fenoles simples y tienen una variedad de estructuras moleculares. Ellos están generalmente divididos en proantocianidinas hidrolizables y condensadas (polímeros de flavan-3-oles) (Haslam, 1989). Los taninos son compuestos biológicamente activos y pueden tener efectos nutricionales benéficos o adversos. Los taninos condensados, compuestos fenólicos predominantes en semillas leguminosas, se encuentran ampliamente en lentejas, granos de soya coloreados, y frijoles comunes (Troszynska *et al.*, 2002; Takahata *et al.*, 2001; Beninger y Hosfield, 2003; Amarowicz *et al.*, 2004). Estos compuestos son los principales componentes de la cascarilla de frijol, han sido reportados en todos los colores de semilla, desde el negro, rojo, café, amarillo, crema e inclusive en el blanco; sin embargo, no está muy clara la relación entre el contenido de taninos y la actividad antioxidante del frijol. Inicialmente se asociaba una mayor actividad en los frijoles negros y más coloridos, contradictorio a lo reportado por Beninger *et al.* (2003) que encontraron la mayor actividad antioxidante en frijol blanco.

7.4.4 Glutathion

El glutathion (**Figura 5**) es un tripéptido (α -glutamyl, cisteína, glicina), que se ha encontrado en sitios celulares como citosol, cloroplastos, retículo endoplasmático, vacuolas y mitocondria. Este participa en el control de los

niveles de H_2O_2 , ya que el cambio de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) se da durante la degradación del H_2O_2 en el ciclo ascorbato glutatión, su función antioxidante es más evidente bajo condiciones de estrés (Foyer *et al.*, 2001; Millar *et al.*, 2003; Foyer y Noctor, 2005).

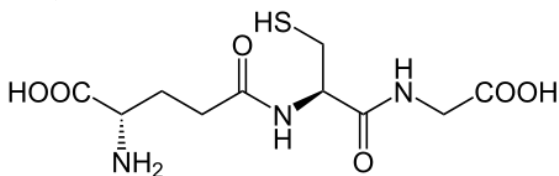


Figura 5 • Fórmula estructural del glutatión (GSH)

Además, tiene otras funciones como: transporte y almacenamiento de S, control del estado redox de la célula, protección de los grupos tiol de las proteínas, participación en el ciclo celular, inducción de expresión de genes de defensa ante patógenos, percepción y respuesta ante estrés abiótico actuando como sensor celular, producción de fitoquelatinas, detoxificación de metales pesados y xenobióticos (Foyer y Noctor, 2005).

7.4.5 Ascorbato

Es un compuesto reductor hidrosoluble muy abundante en las plantas. En su estado reducido actúa como cofactor de enzimas antioxidantes que destruyen diferentes tipos de especies reactivas de oxígeno dentro del ciclo ascorbato-glutatión, por lo que reduce el daño oxidativo en una función sinérgica con otros antioxidantes (Foyer y Noctor, 2005). Así, tiene un papel muy importante en el crecimiento, el desarrollo, y en la respuesta al estrés en las plantas (Debolt *et al.*, 2007).

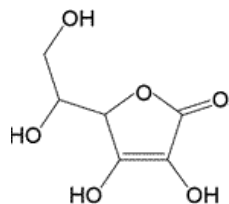


Figura 6 • Fórmula estructura del ascorbato (AsA)

7.4.6 Selenio

Este elemento no ha sido clasificado como un nutriente esencial para las plantas, no obstante, diversas investigaciones han demostrado que es favorable, debido a que actúa como un promotor de la capacidad antioxidante que inhibe la peroxidación lipídica en zacate ryegrass (*Lolium perenne*) (Hartikainen *et al.*, 2000). Además, otros estudios han demostrado que el Se tiene efectos positivos en la acumulación de carbohidratos en el cultivo de papa (Turakainen *et al.*, 2004). Además, estudios recientes han demostrado que el Se promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas y además, puede incrementar su capacidad antioxidante cuando se encuentran sujetas a varios tipos de estrés (Djanaguiraman *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2002). El Se actúa como antioxidante al inhibir la peroxidación de lípidos, como lo mencionan Hartikainen *et al.* (2000) en un trabajo realizado en zacate ryegrass a concentraciones de 0.1 a 1.0 mg Se Kg^{-1} . Otros autores como Djanaguiraman *et al.* (2005) mencionan que mejora el crecimiento y la capacidad antioxidante en el cultivo de soya, ayudando en el estrés oxidativo causado por la radiación UV. Ramos *et al.* (2010) indica que en el cultivo de la lechuga a dosis bajas el Se actúa como antioxidante y además mejora el crecimiento.

En otros reportes se sugiere que el aumento de la capacidad antioxidante al aplicar Se a los diferentes cultivos es debido al incremento de compuestos como el tocoferol y compuestos fenólicos (Lee *et al.*, 2001; Hartikainen *et al.*, 2000; Ríos *et al.*, 2008).

Xu *et al.* (2003) menciona que en plantas de te verde la adición de Se incrementa el contenido de ácido ascórbico por lo que aumenta la capacidad antioxidante. En el cultivo de arroz de igual forma la adición de Se incrementa la capacidad antioxidante (Xu y Hu, 2004).

7.4.7 Biofortificación con Se y su influencia sobre el metabolismo oxidativo en plantas

En condiciones fisiológicas, las principales especies químicas de oxígeno presentes en la célula son: oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), agua (H_2O) e hidróxido (OH^-) (Foyer y Noctor, 2009). El O_2 es una molécula relativamente estable capaz de generar especies mucho más reactivas a través de reacciones de transferencia de energía o de electrones. Las especies de oxígeno reactivo (ROS) son moléculas con moderada (H_2O_2 , O_2^-) o elevada ($\text{OH}\cdot$, $^1\text{O}_2$) reactividad química que se generan durante el metabolismo celular y pueden dañar a distintas biomoléculas. El radical $\text{OH}\cdot$ se origina por reducción del H_2O_2 por cantidades traza de Fe^{2+} y Cu^+ (reacciones Fenton). Este radical $\text{OH}\cdot$ es extremadamente oxidante y reacciona instantáneamente con moléculas próximas, ya que tiene capacidad para iniciar la peroxidación de lípidos. En cambio, el radical O_2^- ó el H_2O_2 no causan daño oxidativo por sí mismos, pero sí intervienen en la formación de ROS y especies de nitrógeno reactivo (RNS) con mayor capacidad oxidante (Halliwell y Gutteridge, 2007). El O_2 oxida a diferentes biomoléculas en función de su localización intracelular, daña las membranas e incluso interviene en la inducción de la muerte celular (Ryter y Tyrrell, 1998) al provocar estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es un desequilibrio en el balance pro-oxidante-antioxidante, donde la ventaja la tiene el primero, lo que puede originar un daño (Sies, 1991). Este desequilibrio puede dar como resultado una disminución de los niveles de antioxidantes, por ejemplo las mutaciones que afectan a la actividad de las enzimas de defensa antioxidante como CuZnSOD o GSH-Px, también puede ser por las toxinas que destruyen las defensas antioxidantes

o el aumento de la producción de especies reactivas (Halliwell y Whiteman, 2004).

La producción de especies reactivas en plantas se produce principalmente en la fotosíntesis, respiración, metabolismo celular, respuesta a estrés y fijación de N_2 . En los cloroplastos el fotosistema I reduce el O_2 a radical O_2^- a través de la reacción de Mehler (fotorreducción de O_2) y el fotosistema II genera radicales O_2^- y $\text{OH}\cdot$. En el interior de los cloroplastos se puede producir O_2 cuando la clorofila transfiere la energía de excitación al O_2 (Apel y Hirt, 2004; Halliwell y Gutteridge, 2007). Posteriormente, en las mitocondrias durante la respiración se reduce el O_2 a H_2O a través de la cadena de transporte de electrones. Esta reducción puede tener lugar por un mecanismo tetravalente (citocromo *c* oxidasa, oxidasa alternativa) y del 1 al 2% del O_2 consumido genera ROS. Esto ocurre principalmente en los complejos I (NADH deshidrogenasa) y III (ubiquinol-citocromo *c* oxidorreductasa) de la membrana interna mitocondrial. La Mn-superóxido dismutasa (SODMn) mitocondrial actúa sobre el radical O_2^- para transformarlo en H_2O_2 , que se reduce por iones Fe^{2+} o Cu^+ a radicales $\text{OH}\cdot$ en reacciones tipo Fenton (Navrot *et al.*, 2007).

En los peroxisomas se produce H_2O_2 durante la fotorrespiración mediante la glicolato oxidasa, la β -oxidación de los ácidos grasos, y la dismutación del radical O_2^- por la SODMn y SODCuZn. El O_2^- se origina en la matriz por acción de la xantina oxidasa y en la membrana por un mecanismo dependiente de NADPH (Del Río *et al.*, 2006). La capacidad de producir y regular la liberación de ROS y RNS al citosol, así como, la proliferación de peroxisomas en respuesta a diversos estreses y durante la senescencia, determinan que estos orgánulos desempeñen un papel clave en la respuesta al estrés oxidativo en las plantas (Corpas *et al.*, 2001; Del Río *et al.*, 2002).

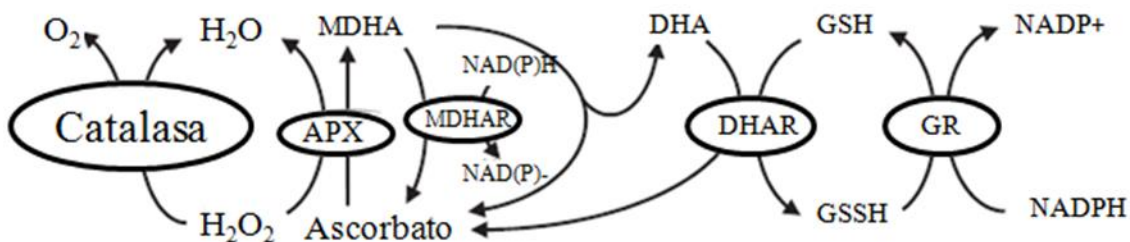
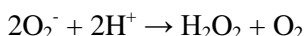


Figura 7 • Ciclo ascorbato-glutation: participan enzimas como la ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), glutatión reductasa (GR) (Foyer y Noctor 2009).

Además de los compuestos con capacidad antioxidante las células vegetales también cuentan con un sistema antioxidante enzimático, donde participan principalmente las enzimas del ciclo ascorbato-glutation, la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px). En el ciclo ascorbato-glutation se lleva a cabo en algunos orgánulos celulares como los cloroplastos, plastidios, mitocondrias y peroxisomas (Fig. 7) (Mittova et al., 2004). El objetivo de este ciclo es eliminar el H_2O_2 que utiliza como donador de electrones la Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato reducido (NADPH). La primera enzima que actúa es la ascorbato peroxidasa (APX), la cual cataliza la reducción de H_2O_2 a agua utilizando el ascorbato reducido (AsA). El producto de esta reacción es el monodehidroascorbato (MDHA), el cual puede oxidarse espontáneamente a dehidroascorbato (DHA). El AsA puede ser regenerado a partir del MDHA por la enzima monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) con oxidación de la Nicotinamida Adenina reducido (NADH) o a partir del DHA por la dehidroascorbato reductasa (DHAR) utilizando el GSH como reductor, el GSH oxidado (GSSG) puede regenerarse por la acción de la enzima glutatión reductasa (GR) (Foyer y Noctor, 2009).

7.4.8 Superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1)

Las SODs son metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical O_2^- :



Es una metaloenzima encargada de la eliminación de O_2^- mediante una reacción de dismutación (Rubio *et al.*, 2007). Se han encontrado tres tipos de SODs, ya que utilizan diferente metal como cofactor: cobre y zinc (SODCuZn), manganeso (SODMn) o hierro (SODFe), los tres tipos de enzimas son sintetizadas en el citoplasma.

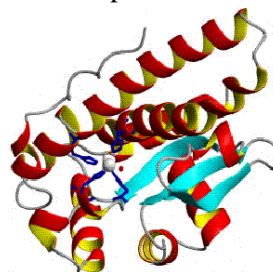


Figura 8 • Estructura de la enzima superóxido desmutasa (SOD)

Las SODCuZn se encuentran en los cloroplastos, peroxisomas y citosol, las SODMn en mitocondrias y peroxisomas, y las FeSOD en cloroplastos (Alscher *et al.*, 2002).

7.4.9 Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6)

La CAT (Fig. 9) es una homoproteína tetramérica que elimina el H_2O_2 sin necesitar el aporte del poder reductor, sin embargo tiene una

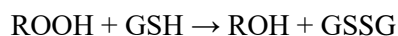
baja afinidad por el sustrato, lo que la hace poco eficiente en la eliminación de H_2O_2 cuando este se encuentra presente en concentraciones bajas. En las plantas la mayoría de la CAT se localiza en los peroxisomas, donde la concentración de H_2O_2 es muy alta (Feierabon, 2005). Esta enzima es una metaloproteína tetramérica, cuyo peso molecular se encuentra en el rango de 210-280 kDa. Consta de 4 subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada subunidad contiene un grupo prostético de protoporfirina IX y el contenido protohémico y el de hierro representan un 1.1 % y 0.09 %, respectivamente, del peso molecular total de la enzima (Hadju *et al.*, 1977).



Figura 9 • Estructura de la enzima catalasa (CAT)

7.4.10 Glutathion peroxidasa (GSH-Px, EC 1.11.1.9)

La enzima GSH-Px cataliza la reducción de hidroperóxidos orgánicos y peróxidos de lípidos, tales como los que se originan en las membranas en situación de estrés, utilizando GSH como donador de electrones (Hartikainen *et al.*, 2000).



Esta enzima comúnmente se encuentra en los cloroplastos de las células vegetales. Su función es eliminar el H_2O_2 y utiliza al GSH como donador de electrones.

En plantas esta enzima se puede clasificar en tres tipos: las selenio-dependientes, las cuales se componen de cuatro subunidades de 16 kDa y se han identificado en *Aloe vera* (Sabeh *et al.*,

1993), y las no selenio-dependientes fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (PHGPXs) y la glutatión transferasa que muestra actividad de glutatión peroxidasa (GST-GPOX) (Eshdat *et al.*, 1997). Sin embargo, esto difiere a lo que indican otros autores, por lo que no existen pruebas suficientes para indicar que la enzima GSH-Px en plantas es selenio-dependiente.

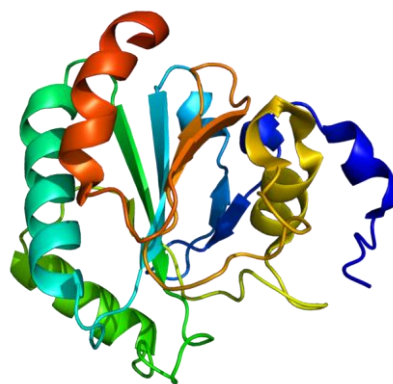


Figura 10 • Estructura de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px)

Ríos *et al.* (2008) indican que el selenio como selenato y selenito de sodio a diferentes dosis de aplicación en plantas de lechuga fueron eficientes para la detoxificación de H_2O_2 . Sin embargo, el selenato fue menos tóxico que el selenito. Además, las plantas tratadas con selenato indujeron una mayor actividad de enzimas detoxificadoras como la ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión peroxidasa (GSH-Px). De la misma forma, en zacate ryegrass el selenato fue más eficiente que el selenito como inductor de la enzima GSH-Px (Cartes *et al.*, 2005). La influencia positiva del Se sobre la actividad de la GSH-Px sugiere que, en plantas, esta enzima es selenodependiente (Hartikainen *et al.*, 2000).

Estudios realizados en plantas de trigo indican que el Se incrementó la actividad de enzimas como la catalasa (CAT) y peroxidasa (POD) a dosis bajas (0.05 mM Kg^{-1}), sin embargo, al incrementar la dosis (0.15 mM kg^{-1}) la actividad se redujo (Nowak *et al.*, 2004). A bajas concentraciones puede también activar a la

enzima POD al mejorar el estrés oxidativo inducido por el aluminio, y participar en la dismutación espontánea del radical superóxido a H_2O_2 (Cartes *et al.*, 2010).

En plantas de colza y zacate ryegrass minimizó el efecto tóxico y el estrés oxidativo causado por los metales pesados (Filek *et al.*, 2008; Cartes *et al.*, 2010). Hawrylak *et al.* (2010) menciona que la adición de selenio en plantas de pepino, provocó el aumento en la producción de prolina y una disminución en la peroxidación de lípidos, lo que ayudo en la resistencia a estrés por frío. El Se incrementa la actividad de la SOD en las plantas de acerera (Kong *et al.*, 2005).

El Se reduce el estrés oxidativo del aluminio en plantas de centeno mediante la dismutación espontánea de los radicales superóxido y la activación de la enzima peroxidasa (Cartes *et al.*, 2010).

7.5 SELENIO EN LA CALIDAD NUTRICIONAL DE LOS CULTIVOS

La interacción de los nutrientes en relación al Se es muy importante, ya que determinan la calidad nutricional del cultivo. El Se y el fósforo (P) no pertenecen al mismo grupo en la tabla periódica, sin embargo, ambos son absorbidos por la planta en forma de aniones, por lo que ha sido muy estudiada dicha

interacción. Cater *et al.* (1972) observó que mediante la aplicación de P al suelo se logró aumentar la concentración de Se en un cultivo de alfalfa. Estudios más recientes como el de Liu *et al.* (2004) respaldan esta información al indicar que la adición de P incrementó el contenido de Se en plantas de arroz, lo que indica una beneficiosa interacción entre estos dos nutrientes. Hawrylak (2008) al respecto, menciona que al adicionar Se en forma de selenito en plantas de maíz el contenido de P y calcio (Ca) aumento, mientras que el contenido de potasio (K) disminuye.

El efecto del Se al aplicar selenito a dosis bajas (5, 10 y 20 $mg\ kg^{-1}$) en plantas acumuladoras como el helecho chino (*Pteris vittata* L.) suprime la absorción de magnesio (Mg), K, hierro (Fe), cobre (Cu) y zinc (Zn), mientras que con altas dosis de selenito (40, 60, 80 y 100 $mg\ kg^{-1}$) incrementó el contenido de Ca, Mg y K. Lo que sugiere que el Ca, Mg y K pudieran estar involucrados en el mecanismo de tolerancia del Se. Sin embargo, el efecto del Se en el contenido nutrimental es variable según el cultivo que se trate (Figura 11).



Figura 11 • Efecto de la aplicación de Se en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike

7.6 INFLUENCIA DEL SELENIO SOBRE EL METABOLISMO NITROGENADO DE LAS PLANTAS

El contenido de nitrógeno (N) en las plantas es determinante para el crecimiento, y el rendimiento es totalmente dependiente de un suministro adecuado (Lawlor, 2002). El Se tiene una influencia sobre el contenido del nitrógeno en la planta según la forma química aplicada de este nutriente. Ríos *et al.* (2010) mencionan que la aplicación de 20 μM de Se en forma de selenato y 5 μM en forma de selenito incrementan el contenido de N en plantas de lechuga, por lo que mejora el uso eficiente del N y por lo tanto beneficia el rendimiento, además aumentó la actividad de enzimas como NR, GS y GOGAT. Jezek *et al.* (2011) mencionan que el metabolismo del Se está estrechamente ligado con el metabolismo nitrogenado de las plantas. Turakainen *et al.* (2006) menciona que en tubérculos de papa la mayoría del contenido de Se es componente de la fracción de proteínas presente (49-65%), dado que las proteínas son uno de los componentes resultantes del metabolismo nitrogenado en las plantas. Mientras que Cuderman *et al.* (2008) indica que en este mismo cultivo el 30% del Se presente es constituyente de proteínas.

El metabolismo nitrogenado está relacionado con el rendimiento en los cultivos, a este respecto, Turakainen *et al.* (2004) señala que el Se tiene un efecto positivo en el incremento del rendimiento. Además, otros estudios como el de Pennan *et al.* (2002) mencionan que el Se incrementa el crecimiento en el cultivo de lechuga.

7.7 SELENIO EN LA NUTRICIÓN Y LA SALUD HUMANA

El consumo en una cantidad adecuada de Se es esencial para la salud humana ya que el selenio es incorporado como un residuo selenocisteinil a las selenoproteínas que son necesarias para las funciones biológicas (Schomburg *et al.*, 2004; Lu y Holmgren, 2009). El adecuado funcionamiento de la hormona tiroidea depende de la disponibilidad de Se (Kohrle, 2005). Este micronutriente es necesario también para el funcionamiento adecuado del sistema inmunológico por su reconocida función protectora contra infecciones virales (Manzanares, 2007). Además, es un componente de las enzimas glutatión peroxidasa, selenoproteína P y la tetraiodotironina 5' deiodinasa. Además, que actúa como agente anticancerígeno bajo una adecuada ingesta (Rayman, 2000).

La deficiencia de Se se relaciona al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, anemia y el incremento en la incidencia de cáncer (Thomson, 2004; Brenneisen *et al.*, 2005). Duffield *et al.* (2002) indican que un consumo de 200 $\mu\text{g día}^{-1}$ de Se reduce la incidencia de cáncer de pulmón y próstata. La recomendación del consumo diario es de 50-70 $\mu\text{g día}^{-1}$ (USDA, 2003); no obstante, un consumo mayor de 400 $\mu\text{g día}^{-1}$ tiene un efecto dañino en la salud (DRI, 2000). La ingesta media en general está en el rango de 20-300 $\mu\text{g día}$ (Patrick, 2004). La biodisponibilidad del Se varía entre los diferentes alimentos, la SeMet (originada en plantas y animales) y SeCis (principalmente originada en animales) tienen alta biodisponibilidad (más del 90%), mientras que la biodisponibilidad del Se en formas inorgánicas como selenato y selenito es del 50% (Thomson, 2004) (**Figura 13**).

Las personas vegetarianas pueden tener baja ingesta de selenio y están en riesgo de presentar

deficiencias (Haydy y Hardy, 2004). El género es también un factor que influye debido al papel del selenio en la expresión de las selenoproteínas (Galan *et al.*, 2005; Hardy y Hardy, 2004; Riese *et al.*, 2006). Algunos estudios han demostrado que el selenio tiene un efecto anticancerígeno mayor en hombres que en mujeres, sin embargo, aun no se han identificado los mecanismos específicos del género (Herberg *et al.*, 2007; Waters *et al.*, 2004; Wolters *et al.*, 2006). Los compuestos orgánicos de Se como la MeSeCis, GGMeSeCis y SeMet son los que actúan como agentes quimioprotectores, en diferentes tipos como cáncer de mama, hígado y próstata (Ip y Ganther 1992; Vadgama *et al.*, 2000; Whanger *et al.*,

2002; 2004). Por lo que, se ha incrementado el interés en aumentar el contenido de Se en las plantas (Ellis *et al.*, 2004). Los selenocompuestos más comunes se presentan en la **Figura 12** (Dumont *et al.*, 2006).

La diferencia entre la SeCis que es la forma orgánica de Se más sintetizada en los tejidos humanos, y la SeMet forma que es más predominante en plantas es muy importante, ya que al final de la degradación en el metabolismo de los humanos, el Se liberado de la SeMet está disponible para la síntesis de novo de la SeCis en las células (**Figura 13**) (Kohrle *et al.*, 2005; Ralston *et al.*, 2008).

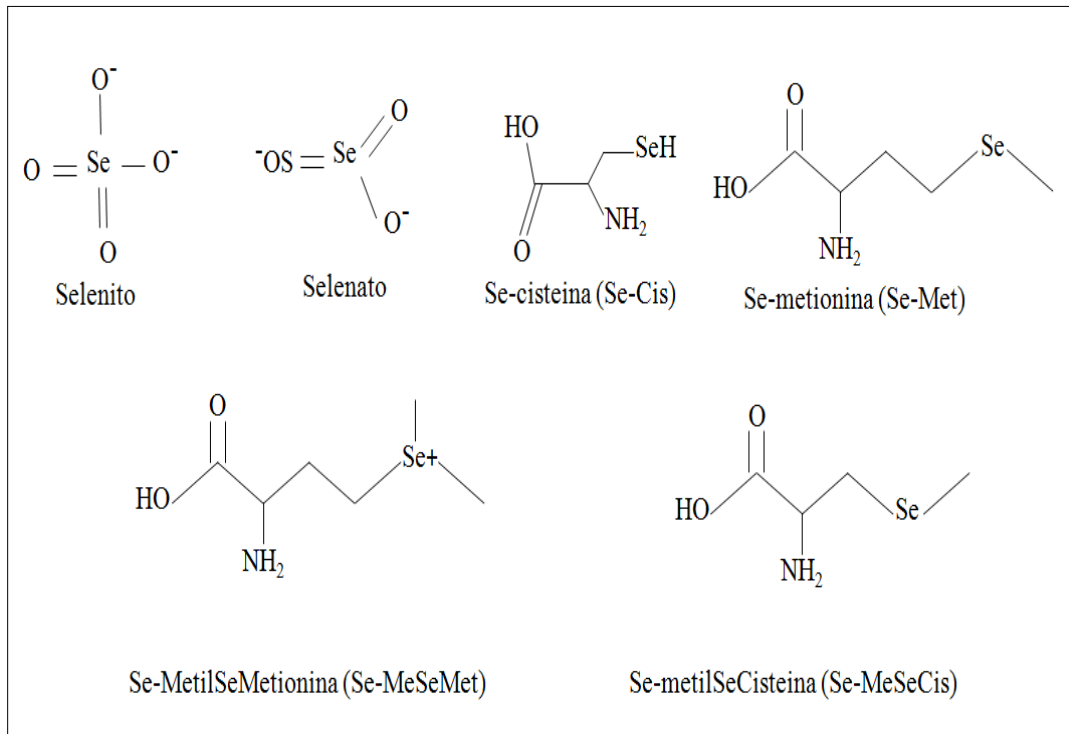


Figura 12 • Selenocompuestos más comunes y su fórmula estructural

La deficiencia de selenio se ha relacionado con el cáncer de mama y el riesgo de infecciones virales como el VIH/SIDA, influenza y hepatitis). Además, enfermedades cardiovasculares, trastornos reproductivos, y enfermedades neurológicas, como el Alzheimer y la Parkinson (Adams, 2008; Papp *et al.*, 2007).

Cada cultivo metaboliza diferentes compuestos orgánicos de Se, por ejemplo, *Allium* y *Brassica* acumulan SeMSeCis, que se pueden convertir en metil selenio (Ip *et al.*, 2002; Whanger 2004). La SeMet es la forma dominante de selenio que se encuentra en los cereales (Fairweather-Tait *et al.*, 2010). Sin embargo, en algunos países, se

pueden encontrar alimentos elaborados con cultivos biofortificados con Se y suplementos con selenoaminoácidos (García-Bañuelos *et al.*, 2011).

Posteriormente la mezcla fue incubada durante 20 min. a 50 °C. Después los tubos se enfriaron sumergiéndolos en hielo y se les añadió 0.5 mL de Cl_3CCOOH al 10%. Después, se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min. y se tomó 1 mL del sobrenadante que resultó y se mezcló con 1 mL de agua destilada y 0.1 mL de FeCl_3 (0.1%), la mezcla se incubó por 10 min. y la absorbancia fue medida a 700 nm. Los valores de absorbancia más altos indican un mayor poder reductor.

7.8 CONSIDERACIONES FINALES

Hasta ahora, el Se no ha demostrado ser esencial para plantas, pero los estudios más recientes muestran que es un elemento benéfico. Por esta razón, es importante dilucidar la vías bioquímicas que subyacen a este efecto positivo en producción vegetal, principalmente porque la deficiencia de Se es un problema mundial de salud pública y las plantas son una excelente fuente de Se que puede ayudar a aliviar esta deficiencia. El papel beneficioso de Se en la nutrición humana se atribuye tanto a los compuestos de Se y para selenoproteínas; sin embargo, hay algunas lagunas en el conocimiento de las formas que ocurren naturalmente. En los alimentos de origen vegetal, quizás la necesidad más importante es saber ¿Qué especies de Se son beneficiosas o perjudiciales para la nutrición humana?. El interés actual se centra en formas metiladas de Se, que ha demostrado proporcionar efectos quimioprotectores contra ciertos tipos de cáncer. Las perspectivas para esta información han aumentado el interés en el desarrollo de productos alimenticios funcionales enriquecidos con Se. Hoy en día, es considerado que el método más prometedor para aumentar la

ingesta de Se es la biofortificación agronómica, que representan un sistema alimentario que podría aumentar la captación de Se en segmentos de la población, aunque es necesario saber más sobre el destino del Se que se aplica al suelo y cómo mejorar la eficiencia de biofortificación agronómica. Esta metodología es más rápida, más económica y menos controvertida que la biofortificación a través de la biotecnología. En general, la investigación sobre el papel beneficioso de Se promete tener aplicaciones muy importantes en áreas tales como biofortificación de cultivos básicos y nutrición humana, siendo un ejemplo notable en la prevención del cáncer. En algunos países, productos alimenticios comerciales elaborados con cultivos biofortificados y tabletas de suplementos dietéticos ya se pueden encontrar con selenoaminoácidos.

7.9 BIBLIOGRAFÍA

- Amarowicz, R., Troszynska, A., Barylko, P. N., y Shahidi, F.** (2004). Polyphenolics extracts from legume seeds: correlations between total antioxidant activity, total phenolics content, tannins content and astringency. *Journal of Food Lipids*. 11: 278-286.
- Apel, K., y Hirt, H.** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399.
- Arvy, M. P.** (1989) Some factors influencing the uptake and distribution of selenite in the bean plant (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Soil* 117: 129-133.
- Arvy, M. P.** (1993) Selenate and selenite uptake and translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *J. Exp. Bot.* 44: 1083-1087.
- Barraza, J. D., Flores, H. A. M., Galvan, H. D., Sánchez, Ch. E. y Glossman, M. D.** (2011) Computational characterization of sodium selenite using density functional theory. *J Mol Model* 17: 701-708.
- Bell, P. F., Parker, D. R., y Page, A. L.** (1992) Contrasting selenatesulfate interactions in selenium-accumulating and nonaccumulating plant species. *Soil Science Society of America Journal* 56: 1818-1824.
- Beninger, C. W., y Hosfield, G. L.** (2003). Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. Seed coat color genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7879-7883.
- Berken, A., Mullholland, M. M., LeDuc, D. L., y Terry, N.** (2002). Genetic engineering of plants to enhance selenium phytoremediation. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 21: 567-582.
- Brenneisen, P., Steinbrenner, H., y Sies, H.** (2005). Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Mol Aspects Med* 26: 256-67.
- Broadley, M. R., White, P. J., Bryson, R. J., Meacham, M. C., Bowen, H. C., Johnson, S. E., Hawkesford, M. J., McGrath, S. P., Zhao, F. J., Breward, N., Harriman, M., y Tucker, M.** (2006) Biofortification of UK food crops with selenium. *Proc Nutr Soc* 65: 169-181.
- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., y Vanderleyden, J.** (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) model food legumes. *Plant and Soil* 252, 55-128.
- Cardador, M. A., Loarca, P. G. y Oomah, B.D.** (2002). Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus Vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50:6975-6980.
- Cartes, P., Gianfera, L. y Mora, M. L** (2005). Uptake of selenium and its antioxidants activity in ryegrass when applied a selenate and selenite form. *Plant Soil* 276: 359-367.
- Cater, D. L., Robbins, C. W., y Brown, M. J.** (1972). Effect of phosphorus fertilization on the selenium concentration in alfalfa (*Medicago sativa*). *Soil Sci Soc Ame Proc* 36: 624-628.
- Chen, L., Yang, F., Xu, J., Hu, Y., Hu, Q., Zhang Y., y Pan, G.** (2002). Determination of selenium concentration of rice in China and effect of fertilization of selenite and selenate on selenium content of rice. *J Agric Food Chem* 50: 5128-5130
- Choung, M. G., Choi, B. R., An, Y. N., Chu, Y. H. y Cho, Y. S.** (2003). Anthocyanin profile of Korean cultivated kidney bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 51: 7040-7043.
- Chung, F., Xu, Y., Ho, C., Desai, D., y Han, C.** (1992). Protection against tobacco-

- specific, nitrosamine induced lung tumorigenesis by green tea and its components, in: Ho, C., Lee, C.Y. y Huang, M. Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health: II. Analysis, Occurrence and Chemistry, American Chemical Society, Washington, DC. Pp. 300–307.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., Del Río, L. A.** (2001). Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci* 6: 145-150
- Crates, P., Jara, A. A., Pinilla, L., Rosas, A. and Mora, M. L.** (2010). Selenium improves the antioxidant ability against aluminum-induced oxidative stress in ryegrass roots. *Ann. Appl. Biol.* 156: 297-307.
- Cuderman, P., Kreft, I., Germ, M., Kovačević, M., y Stibilj V.** (2008). Selenium species in selenium-enriched potatoes and droughtexposed potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 9114–9120.
- Debolt, S., Melino, V., y Ford, C. M.** (2007). Ascorbate as a biosynthetic precursor in plants. *Annals of Botany*. 99: 3-8.
- Del Río, L. A., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Palma, J. M., y Barroso, J. B.** (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol* 141: 330-335
- Dreosti, I. E.** (1996). Bioactive ingredients: antioxidants and polyphenols in tea, *Nutrition Reviews*. 54: S51–S58.
- Drever, J.I.** (1997). The geochemistry of natural waters. 3rd. ed., Prentice Hall, Upper Saddle
- Duckart, E. C., Waldron, L. J., y Donner, H. E.** (1992). Selenium uptake and volatilization from plants growing in soil. *Soil Sci* 153: 94–99
- Dumont, E., Vanhaecke, F., y Cornelis, R.** (2006). Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385: 1304-1323
- Eapen, S., y D’Souza, S. F.** (2005) Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances* 23: 97-114
- Ellis, D. R., Sors, T. G., Brunk, D. G., Albrecht, C., Orser, C., Lahner, B., Wood, K. V., Harris, H. H., Pickering, I. J. y Salt, D. E.** (2004). Production of Se-methylselenocysteine in transgenic plants
- Ellis, D. R., y Salt, D. E.** (2003). Plants, selenium and human health. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 273–279.
- Eshdat, Y., Holland, D., Faltin, Z., y Ben-Hayyim, G.** (1997). Plant glutathione peroxidases. *Physiol Plant* 100: 234-240. A timely review of a rapidly expanding field of interest in plant stress physiology.
- Euroala, M., Hietaniemi, V., Kontturi, M., Tuuri, H., Kangas, A., Niskanen, M., y Saastamoinen, M.** (2004). Selenium content of Finnish oats in 1997–1999: effect of cultivars and cultivation techniques. *Agric Food Sci* 13: 46–53
- expressing selenocysteine methyltransferase. *BMC Plant Biol* 4: 1
- Fageria, N. K., Baligar, V. C. y Jones, C. A.** (1997). Common bean and cowpea. En: *Growth and Mineral Nutrition of Field Crops*. Fageria, N. K., Baligar, V. C. and Jones, C. A. (eds), pp. 441-492, Marcel Dekker, New York, USA.
- Feist, L. J., y Parker, D. R.** (2001). Ecotypic variation in selenium accumulation among populations of *Stanleya pinnata*. *New Phytologist* 149: 61–69.
- Fordyce, F.** (2005). Selenium deficiency and toxicity in the environment. In *Essentials of Medical Geology*, pp. 373–415

- [O Selinus, B Alloway, J Centeno, R Finkelman, R Fuge, U Lindh and P Smedley, editors]. London: Elsevier.
- Foyer, C. H. y Noctor, G.** (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation and practical implications. *Antioxidants and Redox Signaling* 11: 1-45.
- Foyer, C. H., y Noctor, G.** (2005). Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell and Environ* 28: 1056-1071.
- Freeman, J. L., Zhang, L. H., Marcus, M. A., Fakra, S., McGrath, S. P., y Pilon, S. E. A. H.** (2006) Spatial 374 imaging, speciation and quantification of selenium in the hyperaccumulator plants *Astragalus 375 bisulcatus* and *Stanleya pinnata*. *Plant Physiol.* 142: 124–134.
- Galan, P., Briancon, S., Favier, A., Bertrais, S., y Preziosi, P.** (2005). Antioxidant status and risk of cancer in the SU.VI.MAX study: is the effect of supplementation dependent on baseline levels? *Br J Nutr* 94: 125-32.
- García, B. M. L., Hermosillo, C. M. A. Sánchez, C. E.** (2011). The importance of selenium biofortification in food crops. *Current Nutrition & Food Science.* 7: 181-190.
- Gissel-Nielsen, G.** (1998). Effects of selenium supplementation of field crops. In: Frankenberger WT, Engberg RA (eds), *Environmental Chemistry of Selenium.* Marcel Dekker, New York, pp. 99–112
- González, D. E., Guzmán, M. S. H., Acosta, G. J. A., Reynoso, C. R., y Ramírez, R. E., Pons, H. J. L., González, Ch. M. M., Castellanos, J. Z., y Kelly, J. D.** (2003). Effect of cultivar and growing location on the trypsin inhibitors, tannins and lectins of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in the semiarid highlands of Mexico. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5962-5966.
- Gregorio, G.B. et al.** (2000) Breeding for trace mineral density in rice. *Food Nutr. Bull.* 21: 382-386
- Gupta, U. C., y Gupta, S. C.** (2002). Quality of animal and human life as affected by selenium management of soils and crops. *Comm Soil Sci Plant Anal* 33: 15–18
- Hadju, J., Wyss, S. R., y Aebi, H.** (1977). Properties of human erythrocyte catalases after crosslinking with bifunctional reagents: symmetry of the quaternary structure. *Eur J Biochem* 80: 199-207.
- Halliwell, B., y Gutteridge, J. M. C.** (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine,* Ed 4. Oxford University Press, UK
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. M.** (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford, U.K.: Oxford University Press.
- Hamilton, S. J.** (2003). Review of residue-based selenium toxicity thresholds for freshwater fish. *Ecotox Environ Safety* 56: 201–210
- Hanson, B., Garifullina, G. F., Lindblom, S. D., Wangeline, A., Ackley, A., Kramer, A., Norton, A. P., Lawrence, C. B., y Pilon-Smits, E. A. H.** (2003). Selenium accumulation protects Brassica juncea from invertebrate herbivory and fungal infection. *New Phytologist* 159: 461-469.
- Hardy, G., y Hardy, I.** (2004). Selenium: the Se-XY nutraceutical. *Nutr* 20(6):590-3.
- Hartikainen, H., Xue, T. y Piironen, V** (2000). Selenium as an antioxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil,* 225: 193-200.
- Haslam, E.** (1989). *Plant Polyphenols, Vegetable Tannins Revisited.* Cambridge University Press: Cambridge.
- Heijari, J., Kivimäenpää, M., Hartikainen, H., Julkunen-Tiitto, R., y Wulff, A.**

- (2006). Responses of strawberry (*Fragaria x ananassa*) to supplemental UV-B radiation and selenium under field conditions. *Plant and Soil* 282: 27-39.
- Hercberg, S., Ezzedine, K., Guinot, C., Preziosi, P. y Galan P.** (2007). Antioxidant supplementation increases the risk of skin cancers in women but not in men. *J Nutr* 137: 2098-105.
- Ho, C., Lee, C. Y., y Huang, M.** (1992). Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health I. Analysis, Occurrence and Chemistry, American Chemical Society, Washington, DC. Pp. 1-7.
- Hoewyk, D. V., Garifullina, G. F., Ackley, A. R., Abdel-Ghany, S. E., Marcus, M. A., Fakra, I. K., Inoue, E., Pilon, M., Takahashi, H., y Pilon-Smits E. A.** (2005). Overexpression of AtCpNifS enhances selenium tolerance and accumulation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139: 1518-1528.
- Hotz, C., McClafferty, B., Hawkes, C., Ruel, M., y Babu, S.** (2007). From harvest to health: challenges for developing biofortified staple foods and determining their impact on micronutrient status. *Food and Nutrition Bulletin* 28: S271-S279.
- Ip, C., y Ganther, H. E.** (1992). Comparison of selenium and sulfur analogs in cancer prevention. *Carcinogenesis* 13: 1167-1170
- Ip, C., Dong, Y., y Ganther, H. E.** (2002). New concepts in selenium chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev* 21: 281-289
- Islam, F. M. A., Rengifo, J., Redden, R. J., Basford, K. E. y Beebe, S. E.** (2003). Association between seed coat polyphenolics (tannins) and disease resistance in common bean. *Plant Foods Hum. Nutr.* 58: 285-297.
- Ježek, P., Hlušek, J., Lošák, T., Jůzl, M., Elzner, P., Kráčmar, S., Buňka, F., y Martensson, A.** (2011). Effect of foliar application of selenium on the content of selected amino acids in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Plant soil environ* 57: 315-320
- Keskinen, R., Ekholm, P., Yli-Halla, M. y Hartikainen, H.** (2009). Efficiency of different methods in extracting selenium from agricultural soils of Finland. *Geoderma* 153: 87-93.
- Lawlor, D. W.** (2002) Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems, *J. Exp. Botany* 53: 773-787.
- Lee, M.J., Lee, G.P., y Park, K.W.** (2001). Effect of selenium on growth and quality in hydroponically-grown Korean Mint (*Agastache rugosa*). *J. Korean Soc. Hortic. Sci.* 42: 483-486.
- Li, H. F., McGrath, S. P., y Zhao, F. J.** (2008). Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytologist* 178: 92-102.
- Liu, Q., Wang, D. J., Jiang, X. J. y Cao, Z. H.** (2004). Effects of the interactions between selenium and phosphorus on the growth and selenium accumulation in rice (*Oryza Sativa*). *Environmental Geochemistry and Health* 26: 325-330.
- Longnecker, N.E., y Uren, C.** (1990). Factors influencing variability in manganese content of seeds, with emphasis on barley (*Hordeum vulgare*) and white lupins (*Lupinus albus*). *Australian Journal of Agricultural Research* 41: 29-37.
- Lu, J. X., Jiang, C., Kaeck, M., Ganther, H., Vadhanavikit, S., Ip. C. y Thompson, H.** (1995). Dissociation of the genotoxic and growthinhibitory effects of selenium. *Biochemical Pharmacology* 50: 213-219.
- Lyons, G., Ortiz, M. I., Stangoulis, J., y Graham, R.** (2005). Selenium concentration in wheat grain: is there

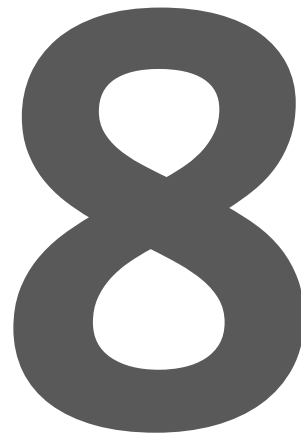
- sufficient genotypic variation to use in breeding? *Plant Soil* 269: 269–380
- Lyons, G. H., Stangoulis, J. C. R., y Graham, R. D.** (2004). Exploiting micronutrient interaction to optimize biofortification programs: the case for inclusion of selenium and iodine in the HarvestPlus program. *Nutr Rev* 62: 247–252
- Lyons, G.H. et al.** (2005) Selenium distribution in wheat grain, and the effect of postharvest processing on wheat selenium content. *Biol. Trace Elem. Res.* 103: 155–168
- Mengel, K. y Kirkby, E. A.** (1987). Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute, Bern, pp: 687.
- Millar, A. H., Mittova, V. y Kiddle, G.** (2003). Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiol* 133: 443–447
- Mittova, V., Guy, M., Tal, M., y Volokita, M.** (2004). Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of Experimental Botany.* 55: 1105–1113.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., y Jacquot, J. P.** (2007). Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol Plant* 129: 185–195.
- Nestel, P., Bouis, H. E., y Meenakshi J. V.** (2006). Biofortification of staple food crops. *Journal of Nutrition* 136: 1064–1067.
- Nowak, J., Kaklewski, K. y Ligocki, M.** (2004). Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. *Soil Biol. Biochem.*, 36: 1553–1558.
- Patrick L** (2004) *Alt Med Rev* 9:239–258.
- Peng, X. L., Liu, Y. Y. y Luo, S. G.** (2002). Effects of selenium on lipid peroxidation on lipid peroxidation and oxidizing ability of rice roots under ferrous stress. *J. Northeast Agric. Univ.* 19: 9–15.
- Ramos, S J., Faquin, V., Guilherme, L R G., Castro, E M., Ávila, F W., Carvalho, G S., Bastos, C. E. A., y Oliveira, C.** (2010). Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. *Plant soil environ* 12: 584–588.
- Reilly, C.** (1998). Selenium: A new entrant into the functional food arena. *Trends in Food Science and Technology* 9: 114–118.
- Riese C, Michaelis M, Mentrup B, Gotz F, y Kohrle J.** (2006). Selenium-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues. *Endocrinology* 147(12):5883–92. River, NJ, p. 193.
- Romani, A., Vignolini, P., Galardi, C., Mulinacci, N., Benedettelli, S., y Heimler, D.** (2004). Germplasm characterization of Zolfino landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) by flavonoid content. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3838–3842.
- Rui, H. L.** (2004). Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *The American Society for Nutritional Sciences J. Nutr.* 134: 3479S–3485S
- Ryter, S. W., y Tyrrell, R. M.** (1998). Singlet molecular oxygen (1O_2): a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radic Biol Med* 24: 1520–1534
- Sabeh, F., Wright, T., y Norton, S. J.** (1993). Purification and characterization of a glutathione peroxidase from the *Aloe vera* plant. *Enzyme Protein* 47: 92–98.
- Salinas, M. Y., Rojas, H. L., Sosa, M. E., y Pérez, H. P.** (2005). Anthocyanin composition in black bean varieties grown in Mexico. *Agrociencia.* 39: 385–394.

- Sands, D. C., Morris, C. E., Dratz, E. A., y Pilgeram, A.L.** (2009). Elevating optimal human nutrition to a central goal of plant breeding and production of plant-based foods. *Plant Sci.* 177: 377-389.
- Schomburg, L., Schweizer, U., y Kohrle, J.** (2004). Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic. *Cell Mol Life Sci* 61(16):1988-95.
- Shardendu, U., Salhani, N., Boulyga, S. F., y Stengel, E.** (2003). Phytoremediation of selenium by two helophyte species in subsurface flow constructed wetland. *Chemosphere* 50: 967-973
- Singh, S. P.** (1999). Production and utilization. In: Singh, S. P. (Ed.), *Common Bean Improvement in the Twenty-First Century*. Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 1-24.
- Smrkolj P., Osvald M., Osvald J., Stibilj V.** (2007) Selenium uptake and species distribution in selenium-enriched bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds obtained by two different cultivations. *European food research & technology*. Vol. 225, n°2, pp. 233-237
- Sors, T. G., Ellis, D. R., y Salt, D. E.** (2005). Selenium uptake, translocation, assimilation, and metabolic fate in plants. *Photosynth Res* 86:373-389.
- Spallholz, J. y Hoffman, D.** (2002). Selenium toxicity: cause and effects in aquatic birds. *Aquat. Toxicol.*, 57: 27-37.
- Takahata, Y., Ohnishi, K. M., Furuta, S., Takahashi, M., y Suda, I.** (2001). Highly Polymerized Procyanidins in Brown Soybean Seed Coat with a High Radical-Scavenging Activity. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5843-5847.
- Takeoka, G. R., Dao, L.T., Full, G. H., Wong, R. Y., Harden, L. A., Edwards, R. H. y Berrios, J. D. J.** (2003). Characterization of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:7040-7043.
- Terry, N., Zayed, A. M, De Souza, M. P., y Tarun, A. S.** (2000). Selenium in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 401-432.
- The World Bank,** (2006). Repositioning nutrition as central to development. A strategy for large-scale action. The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank, Washington.
- Thomson, C. D.** (2004). Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *Eur J Clin Nutr* 58: 391-402.
- Troszynska, A., Estrella, I., López, A. M. L., y Hernández, T.** (2002). Antioxidant Activity of Pea (*Pisum sativum* L.) Seed Coat Acetone Extract. *Lebensmittel-Wissenschaft und Tech.* 35: 158-164.
- Turakainen, M., Hartikainen, H., y Seppänen, M. M.** (2004). Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentrations of soluble sugars and starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5378-5382.
- Turakainen, M.** (2007). Selenium and its effects on growth, yield and tuber quality in Potato. Thesis. FIN-00014 University of Helsinki.
- Turakainen, M., Hartikainen, H., Ekholm P., y Seppänen, M. M.** (2006). Distribution of selenium in different biochemical fractions and raw darkening degree of potato (*Solanum tuberosum*) tubers supplemented with selenate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 8617-8622.
- Turakainen, M.** (2007). Selenium and its effects on growth, yield and tuber quality

- in potato. University of Helsinki, Helsinki. ISBN: 9521034661, pp:50.
- Vadgama, J. V., Wu, Y., Shen, D., Hsia, S. y Block, J.** (2000). Effect of selenium in combination with Adriamycin or Taxol on several different cancer cells. *Anticancer Res* 20:1391–1414
- Varo, P., Alfthan, G., y Huttunen, J. K.** (1994). Nationwide Selenium Supplementation Effects on Diet, Blood and Tissue Levels, and Health. In *Selenium in Biology and Human Health*, R.F. Burk (Ed.), New York: Springer Verlag. 197–218.
- Waters, D. J., Chiang, E. C., Cooley, D. M., y Morris, J. S.** (2004). Making sense of sex and supplements: differences in the anticarcinogenic effects of selenium in men and women. *Mutat Res* 551:91-107.
- Welch, R. M., House, W. A., Beebe, S., y Cheng, Z.** (2000). Genetic selection for enhanced bioavailable levels of iron in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 48: 3576–3580.
- Whanger, P. D.** (2002). Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *J Am College Nutr* 21: 223–232
- Whanger, P. D.** (2004). Selenium and its relationship to cancer: an update. *Br J Nutr* 91: 11–28
- White, P. J., Bowen, H. C., Parmaguru, P., Fritz, M., Spracklen, W. P., y Spiby, R. E.** (2004). Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 55: 1927–1937.
- White, P. J. y Broadley, M. R.** (2005). Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends Plant Sci.* 10:586-593.
- Who** (2002). The World Health Report. Reducing risks, promoting healthy life. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2002:1–230.
- Wolters, M., Hermann, S., Golf, S., Katz, N., y Hahn, A.** (2006). Selenium and antioxidant vitamin status of elderly German women. *Eur J Clin Nutr* 60: 85-91.
- Ximenez, E. P., Alonso, I., Madrid, A. Y., y Camara, C.** (2004). Establishment of selenium uptake and species distribution in lupine, india mustard and sunflower plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 832-838.
- Xu, B. J., Yuan, S. H. y Chang, S. K. C.** (2007). Comparative Analyses Of Phenolic Composition, Antioxidant Capacity, And Color Of Cool Season Legumes And Other Selected Food Legumes. *Journal of Food Science.* 2:167-177.
- Xu, J. y Hu, Q.** (2004). Effect of foliar application of selenium on the antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts of selenium enriches rice. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1759-1763.
- Xu, J., Zhu, S., Yang, F., Cheng, L., Hu, Y., Pan, G., y Hu, Q.** (2003). The influence of selenium on the antioxidant activity of green tea. *J. Sci. Food Agric.* 83: 451–455.
- Yamasaki, H., Shimoji, H., Ohshiro, Y., y Sakihama, Y.** (2001). Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric Oxide* 5: 261-270
- Yu, X. Z. y Gu, J. D.** (2008). Differences in uptake and translocation of selenate and selenite by the weeping willow and hybrid willow. *Environ Sci Pollut Res* 15:499–508
- Zayed, A. M., Lytle, C. M., y Terry, N.** (1998). Accumulation and volatilization of difference chemical species of selenium by plants. *Planta* 206:284–292

Zhou, X., Yuan, Y., Yang, Y., Rutzke, M., Thannhauser, T. W., Kochian, L. V., y Li, L. (2009). Involvement of a broccoli COQ5 methyltransferase in the production of volatile selenium compounds. *Plant Physiol* 151:528-540.

Importancia de la Nanotecnología en la biofortificación con micronutrientes en cultivos agrícolas



Ledezma Delgadillo, Aleana; Sánchez Chávez, Esteban.

8

Importancia de la Nanotecnología en la biofortificación con micronutrientes en cultivos agrícolas

Ledezma Delgadillo, Aleana; Sánchez Chávez, Esteban.

Una nutrición saludable se basa en la cantidad equilibrada de frutas, verduras, cereales y carne, alimentos básicos para un óptimo crecimiento de bebés, niños, adolescentes y adultos, para lograr un futuro más sostenible y próspero. Sin embargo las diferentes causas de malnutrición no han disminuido significativamente en muchos países, debido a un escaso acceso de alimentos y sobre todo que las cantidades de vitaminas y minerales son insuficientes o no nutritivos, los cuales cuando faltan provocan desnutrición, sobrepeso u obesidad, disminuyendo además, el riesgo de bajo peso al nacer y anemia en las mujeres en edad reproductiva. La situación del hambre se produce mayormente en países donde los sistemas agrícolas están expuestos a diferentes cambios climáticos como las precipitaciones, la temperatura, la sequía y el aumento de población desproporcional donde el principal alimento son los cultivos agrícolas de la región. Para el año 2030 se debe lograr disminuir o mitigar la malnutrición en todas sus formas empleando diferentes medidas donde estén a la mano del consumidor a un bajo costo y que contengan vitaminas y minerales necesarios para el saludable desarrollo de niños y mujeres embarazadas principalmente, quienes son más vulnerables a esta situación mundial. Aunque continúan realizándose ciertos progresos en la reducción del retraso del crecimiento, casi 151 millones de niños menores de cinco años de todo el mundo, o más del 22% resultaron afectados por retraso del crecimiento en 2017.

Los análisis de los datos de la FIES (escala de experiencia de inseguridad alimentaria) recogidos por FAO (Organización de las Naciones Unidas) en más de 140 países revelan que, África, América Latina y Asia, tiene una grave inseguridad alimentaria, ligeramente, más alta entre las mujeres, con diferencias más amplias encontradas en América Latina (FAO,

2018) en la **Figura 1** se muestra una grafica de datos recopilados de un informe de la FAO sobre el porcentaje de personas que tienen desnutrición desde el año 2005 hasta el año 2017, en estos datos se muestra que la tendencia va en un aumento lento, sin embargo esto tiene que cambiar, como muestra tenermos los países de Europa y América Septentrional que cada año han sido menor a 2.5 % .

Cabe señalar que los seres humanos necesitamos mínimo 44 nutrientes conocidos en cantidades adecuadas para vivir sanos y ser productivos. S. Yashveer et al.(2014) menciona que “existen herramientas agrícolas (por ejemplo, diversificación, selección, fertilizantes, sistemas de cultivo, enmiendas del suelo, producción pecuaria pequeña, acuicultura, etc.) que podrían utilizarse para aumentar la producción de nutrientes de los sistemas agrícolas. La biofortificación (el desarrollo de cultivos alimentarios que se fortifican a sí mismos) es la primera herramienta agrícola que se está empleando para abordar la desnutrición de micronutrientes en todo el mundo”.

La biofortificación se basa en aumentar la adición de micronutrientes en suelo o directamente en la planta, dependiendo su genética y las necesidades en las etapas del crecimiento de los cultivos agrícolas(Das et al. 2017), aumentando el contenido de nutrientes en las partes comestibles de los cultivos agrícolas y en consecuencia poder reducir la desnutrición y mejorar la seguridad alimentaria a nivel mundial (Márquez-Quiroz et al. 2015). Los micronutrientes para la producción de cultivos agrícolas incluyen hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu) y molibdeno (Mo) entre otros. Comparado con los macronutrientes (N, P y K) solo son cantidades mínimas de micronutrientes, no obstante cada uno de ellos proporciona a las plantas, propiedades particulares que hacen al producto saludable y

nutritivo para su consumo. Las técnicas agrícolas que utilizan la biofortificación en las plantas ya se están empleando actualmente sin embargo, la cantidad y los métodos que se utilizan para la adición de estos minerales siguen provocando grandes pérdidas económicas y una baja absorción de la planta, debido a su gran tamaño estructural, mínima aprovechamiento del suelo por volatilización o lixiviación o bien, por suelos altamente salinos.

Por lo tanto se deben explorar nuevas herramientas que sean más eficaces para su absorción y disminuir los daños ambientales que se están generando hoy en día.

La nanotecnología es una ciencia innovadora y considerada como una herramienta prometedora que puede aumentar significativamente la producción de cultivos y alimentar a la población que se encuentra en aumento exponencial (Liu and Lal 2015).

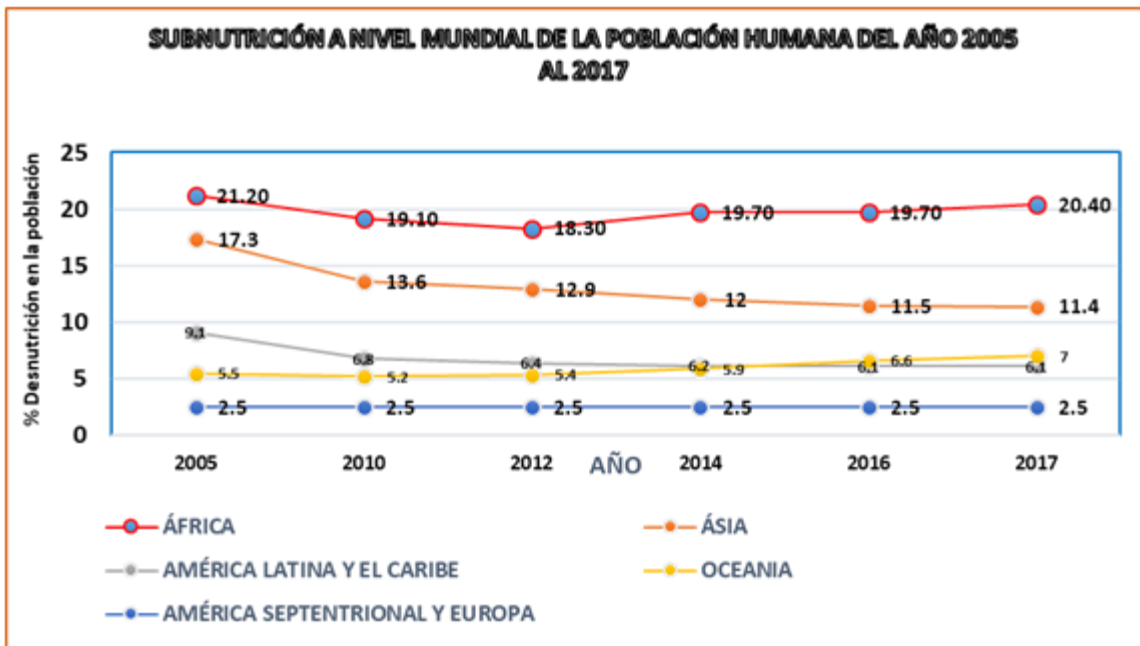


Figura 1 • Tendencia de la subalimentación (Desnutrición) a nivel mundial. Fuente: FAO 2018.

Los fertilizantes pueden ser tamaños nanoestructurados con diferentes técnicas de síntesis o bien encapsularse en diferentes materiales sintéticos o naturales, Ledezma-Delgado 2016, VISHWAKARMA, 2018 entre otros mencionan una clasificación más robusta sobre las diferentes técnicas que existen para la síntesis y caracterización de los diferentes materiales que se pueden utilizar para la nanoencapsulación de estos micronutrientes.

La combinación de la biofortificación y la nanotecnología puede ser una nueva alternativa

científica en el área de la agricultura y la nutrición de los alimentos para la salud humana que, tiene como objetivo el nanoencapsulamiento y protección de micronutrientes minerales con materiales biodegradables sobre los cultivos agrícolas, mitigando los cambios de pH en el suelo, reduciendo su tamaño para que sean absorbidos eficazmente en la raíz o en las hojas y en consecuencia disminuir los trastornos nutricionales en la población humana como anemia, carencia de vitaminas o alteraciones en el crecimiento y respuesta inmune por la falta de

estos nutrientes minerales en la parte comestible de la planta, así como la baja producción de metabolitos secundarios, derivados del estrés causado en la planta por la falta de absorción de estos minerales (Márquez-Quiroz et al. 2015). Los fertilizantes en tamaño nanoestructurado o como les nombran “nanofertilizantes” tienen como función principal suministrar gradualmente nutrientes minerales a los cultivos agrícolas siendo más eficiente su índice de absorción y disminuyendo el daño ambiental que ocurre en el suelo y el aire (Naderi , Danesh, & Naderi, 2011).

Cuadro 1 • Cambios físicos y fisiológicos en las plantas por la absorción de nanopartículas metálicas



Los nanofertilizantes se dividen en tres tipos: nanofertilizantes con macronutrientes, nanofertilizantes con micronutrientes y nanofertilizantes con que contienen capas poliméricas como materiales de protección. Dado que el desarrollo y la aplicación de nanofertilizantes aún se encuentran en las etapas iniciales, existen pocas investigaciones específicas o estudios sistémicos sobre los efectos y ventajas de la aplicación de nanofertilizantes de micronutrientes en condiciones de campo Liu 2015. A continuación se presenta un resumen de los resultados de investigaciones más recientes sobre

nanopartículas de algunos micronutrientes que podrían mejorar el crecimiento y la cantidad de minerales en las plantas.

Los trabajos siguientes promueven el uso de la nanotecnología para mejorar la biofortificación en las frutas y verduras y contrarrestar la desnutrición que va en aumento como se observó en la **Figura 1**.

El uso de nanopartículas metálicas como nanonutrientes es una herramienta prometedora en cualquier cultivo agrícola (Hatami et al.2016). (Dietz y Herth 2011) dependiendo lo siguiente.

- ❖ Diseño en el intercambio de electrones dependiendo la superficie
- ❖ Capacidades reactivas de alta superficie
- ❖ Adición foliar o edáfica
- ❖ Tamaño de nanopartículas

- ❖ Concentración de solución de las nanopartículas
- ❖ Tamaño de los poros donde se adicionara la solución
- ❖ Tipo de cultivo
- ❖ Tipo de micronutriente que se evaluara

Los alimentos de origen agrícola pueden mejorar su contenido nutritivo si combinamos la ciencia de la nanotecnología atrayendo una extensa transformación aumentando su producción y mejorando la calidad de manera equitativa y sostenible, con daños mínimos o nulos en el campo agrícola (Godfray et al., 2010).por lo tanto el uso de nanonutrientes puede ser una alternativa rápida, económica y sobre todo no toxica hacia el campo y la población humana si se manejan de manejan en el momento oportuno sobre los cultivo agrícolas.

Cuadro 2 • Aplicaciones de los micronutrientes en tamaño nanoestructurado encapsulado o sin encapsular en algún material biocompatible con el suelo y/o planta.

TIPO DE NANOPARTÍCULAS	CARACTERÍSTICAS DE APLICACIÓN PARA CULTIVO	TAMAÑO DE LA NANOPARTÍCULA	MUESTRA VEGETAL DE PRUEBA	CAMBIOS FISIOLÓGICOS EN LA PLANTA	REFERENCIA
Quitosano/ácido acético/ tripolifosfato de sodio con sulfato de Zin (NPS-QS-Zn)	Cultivo en granos de arena gruesa. Adición por vía foliar cada semana durante 5 semanas Adición de las NPS a partir del desarrollo del grano.	NPS-QS 290 ± 35 nm NPS-QS-Zn 325 ± 40 nm carga del a superficie NP-QS+32.2 mV y NPS-QS-Zn +42 mV,	Diferentes genotipos de trigo (<i>Triticum durum</i> genotypes viz., MACS 3125 y UC 1114)	Aumento en el contenido de 35 % Zn y 8% Fierro y 9% de sólidos de proteína con respecto al control.	(Deshpande et al. 2017), (Dapkekar et al. 2018)
Vesículas de membrana plasmática extraídas de hojas de brócoli combinadas con 0.1% de polieter modificado con polisiloxano (Brassica oleracea) que contienen Zinc.	Cultivo en hidroponía con adición de las NPS vía foliar.	427.3 nm	Germinados de Brócoli (<i>Brassica oleracea</i>) y col asiática (<i>Pak Choi</i>)	Aumento de 58% en el contenido de Zn en Brocoli y 48% en la col asiática con respecto al control.en las partes de la hoja	(Rios and Carvajal 2018)
Nanopartículas	Nanopartículas de Zn	322±128 nm	Cilantro	Aumento en la	(Reddy

comerciales de Zn	combinadas con 350 g de suelo en bolsas de polietileno por cada planta		(<i>Coriandrum sativum</i>)	cantidad de clorofila de 58% . Disminución hasta del 72% de peroxidación de lípidos(antiestres),	Pullagurala, et al (2018)
Nanopartículas comerciales de Cobre (NPS-Cu) NPS-Cu comerciales de KOCIDE-DUPONT 3000.	Cultivo en suelo protegido en invernadero con condiciones controladas La frecuencia de aspersión fue dos veces por semana. Se realizaron un total de ocho aspersiones por cosecha.	Tamaños combinados micro y nano. 1532 ± 580 nm	Lechuga (<i>Lactuca Sativa</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de vitaminas C, E y B3. • Mayor absorción de Potasio, Zn y Fe. • Incremento de ciertos aminoácidos 	(Zhao et al. 2016)
Nanopartículas de Óxido de Zinc (NPS-Zn) y Nanopartículas de Hierro (NPS-Fe) producidas de Alfa Aesar.	Inmersión de las semillas en la solución de las NPS-Zn y NPS-Fe trasplante en macetas en un invernadero con condiciones controladas.	NPS-Zn = 20-30 nm NPS-Fe = 50-100 nm	Trigo variedad Lassani-2008	66% de incremento en la absorción de Zn(concentración 100mg/L de las NPS-Zn) y 100% Fe en comparación con el control (concentración de 20 mg/L NPS-Fe) Reducción del estrés oxidativo, aumento de clorofila a, clorofila b, carotenoides e índice de transpiración.	(Rizwan et al. 2019)
Nanopartículas de Hierro (NPS-Fe)	Se realizaron dos aspersiones vía foliar	No se menciona	Trigo	Incremento en peso de la espiguilla 24.3% y 15.66% del grano, comparado con el control. 19.44% más de peso en proteína comparada con el control	Mitra Bakhtiari 2015
Nanopartículas de Zn	Se realizó 1 aspersión por día durante 10 días en la etapa de germinación de la semilla	50-100 nm	Frijol chino (<i>vigna Radiata</i>)	Aumento de proteínas Aumento de lípidos Incremento de clorofila Incremento en la elongación de raíz peso y longitud de germinación comparado con el control	PATRA 2013
Nanopartículas de de Óxido de Zinc (NPS-ZnO) comerciales de SRL Pvt. Ltd Company	Se realizó inmersión de las semillas en una solución de Sulfato de Zinc durante 5 horas. A los 30 días de crecimiento se adicionó por aspersión la solución de NPS-ZN vía foliar nanopartículas de Óxido de Zinc y a los 60 días nuevamente se	30 nm	Arroz (<i>Oryza sativa</i>) variedad KMP-175	Incremento del 26.59% de Zn en las hojas y 17.78% más en las semillas comparado con las nutridas con sulfato de Zinc (ZnSO ₄) como fertilizante	Rameshradd y1 • G. 2017

	realizó otra aspersión vía foliar.				
Nanopartículas de óxido de Zinc comerciales de Sigma-Aldrich Company, California, USA	Las NPS-ZnO se adicionaron al medio de cultivo en cajas de Petri para el crecimiento de los callos durante 27 días.que provenían de una plántula de 3 semanas de desarrollo vegetal.	30 nm	Jitoamte (<i>Solanum lycopersicum</i> Mill): se utilizaron 5 tipos de variaciones para el crecimiento de los callos: 1) <i>Solanum lycopersicum</i> Mill.(Edkawy 2) <i>Solanum lycopersicum</i> Mill. convar. <i>infiniens</i> Lehm. var. <i>Flammatum</i> (Anna Aasa), 3) <i>Solanum lycopersicum</i> Mill (Austalische Rosen), 4) <i>Solanum lycopersicum</i> Mill. convar. <i>infiniens</i> Lehm. var. <i>commune</i> (Sankt Ignatius) 5) <i>Solanum lycopersicum</i> Mill. convar. <i>fruticosum</i> Lehm. var. <i>pygmaeum</i> Lehm.Sand Point.	Incremento en la producción de proteínas con el germoplasma Edkaw. Aumento de Zn entre 15-50% en todas variaciones del germoplasma del fruto de tomate.	Hesham F. Alharby 2016
Nanopartículas de hierro	Las nanopartículas de hierro se via foliar cada 3 días durante 45 en las plántulas que se encontraban en macetas que contenían perlita como sustituto del suelo en un invernadero con control de temperatura	143.8 ± 90 nm	Chile morrón <i>Capsicum annuum</i>	Aumento en la producción de cloroplastos Incremento en la longitud de la planta No existio diferencia significativa en la absorción de Fe en la planta comparada con el control	Junxia Yuan 2017

13.1 BIBLIOGRAFÍA

- Alharby, Hesham F., Ehab M. R. Metwali, Michael P. Fuller, and Amal Y. Aldhebiani.** 2016. "Impact of Application of Zinc Oxide Nanoparticles on Callus Induction, Plant Regeneration, Element Content and Antioxidant Enzyme Activity in Tomato (*Solanum Lycopersicum* Mill.) under Salt Stress." *Archives of Biological Sciences*.
- Bakhtiari, Mitra, Payam Moaveni, and Behzad Sani.** 2015. "The Effect of Iron Nanoparticles Spraying Time and Concentration on Wheat." *Biological Forum - An International Journal* 7(1):679–83.
- Dapkekar, Ashwin, Paresh Deshpande, Manoj D. Oak, Kishore M. Paknikar, and Jyutika M. Rajwade.** 2018. "Zinc Use Efficiency Is Enhanced in Wheat through Nanofertilization." *Scientific Reports* 1–7.
- Das, Arpita, Samrat Laha, Sanchita Mandal, Sukanta Pal, and Mohammed Wasim Siddiqui.** 2017. *Preharvest Biofortification of Horticultural Crops*. Elsevier Inc.
- Deshpande, Paresh, Ashwin Dapkekar, Manoj D. Oak, Kishore M. Paknikar, and Jyutika M. Rajwade.** 2017. "Zinc Complexed Chitosan/TPP Nanoparticles: A Promising Micronutrient Nanocarrier Suited for Foliar Application." *Carbohydrate Polymers* 165:394–401.
- Dietz, Karl Josef and Simone Herth.** 2011. "Plant Nanotoxicology." *Trends in Plant Science* 16(11):582–89.
- Hatami, Mehrnaz, Khalil Kariman, and Mansour Ghorbanpour.** 2016. "Engineered Nanomaterial-Mediated Changes in the Metabolism of Terrestrial Plants." *Science of the Total Environment* 571(August 2017):275–91.
- Liu, Ruiqiang and Rattan Lal.** 2015a. "Potentials of Engineered Nanoparticles as Fertilizers for Increasing Agronomic Productions." *Science of the Total Environment* 514:131–39.
- Liu, Ruiqiang and Rattan Lal.** 2015b. "Potentials of Engineered Nanoparticles as Fertilizers for Increasing Agronomic Productions." *Science of the Total Environment*.
- Márquez-Quiroz, César, Moisés Guillén-Molina, Efraín De La Cruz-Lázaro, Guillermo Castañón-Nájera, Luís Latournerie-Moreno, and Sayani Teresa López-Espinosa.** 2015. "La Biofortificación de Cultivos: Una Alternativa Que Contribuye a La Seguridad Alimentaria y Nutricional." *UJED Editorial* (September):14–22.
- Naderi, M. R. and A. Danesh-Shahraki.** 2013. "Nanofertilizers and Their Roles in Sustainable Agriculture." *International Journal of Agriculture and Crop Sciences IJACS/2013:2229–32*.
- Patra, Prasun, Samrat Roy Choudhury, Subhankar Mandal, Anirban Basu, Arunava Goswami, Robin Gogoi, Chitra Srivastava, Rajesh Kumar, and Madhuban Gopal.** 2013. "Effect Sulfur and Zn Nanoparticles on Stress Physiology and Plant (*Vigna Radiata*) Nutrition." in *Springer Proceedings in Physics*.
- Rameshraddy, G. J. Pavithra, B. H. Rajashekar Reddy, Mahesh Salimath, K. N. Geetha, and A. G. Shankar.** 2017. "Zinc Oxide Nano Particles Increases Zn Uptake, Translocation in Rice with Positive Effect on Growth, Yield and Moisture Stress Tolerance." *Indian Journal of Plant Physiology*.
- Reddy Pullagurala, Venkata L., Ishaq O. Adisa, Swati Rawat, Bojeong Kim, Ana C. Barrios, Illya A. Medina-Velo, Jose A. Hernandez-Viezcas, Jose R. Peralta-Videa, and Jorge L. Gardea-Torresdey.** 2018. "Finding the Conditions for the Beneficial Use of ZnO Nanoparticles towards Plants-A Review." *Environmental Pollution*.
- Rios, J. J. and M. Carvajal.** 2018. "PT." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.
- Rizwan, Muhammad, Shafaqat Ali, Basharat Ali, Muhammad Adrees, Muhammad Arshad, Afzal Hussain, Muhammad Zia ur Rehman, and Aisha Abdul Waris.** 2019. "Zinc and Iron Oxide Nanoparticles Improved the Plant Growth and Reduced the Oxidative Stress and Cadmium

Concentration in Wheat.” *Chemosphere* 214:269–77.

Takeuchi, Masami T., Mina Kojima, and Manfred Luetzow. 2014. “State of the Art on the Initiatives and Activities Relevant to Risk Assessment and Risk Management of Nanotechnologies in the Food and Agriculture Sectors.” *Food Research International*.

Vishwakarma, Kanchan, Neha Upadhyay, Nitin Kumar, Durgesh K. Tripathi, Devendra Kumar Chauhan, Shivesh Sharma, and Shivendra Sahi. 2018. “Potential Applications and Avenues of Nanotechnology in Sustainable Agriculture.” in *Nanomaterials in Plants, Algae, and Microorganisms*.

Yashveer, Shikha, Vikram Singh, Vineet Kaswan, Amit Kaushik, and Jayanti Tokas. 2014. “Green Biotechnology, Nanotechnology and Bio-Fortification: Perspectives on Novel Environment-Friendly Crop Improvement Strategies.” *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 30(2):113–26.

Yuan, Junxia, Yu Chen, Huasheng Li, Jinying Lu, Hui Zhao, Min Liu, Galina S. Nechitaylo, and Natalia N. Glushchenko. 2018. “New Insights into the Cellular Responses to Iron Nanoparticles in Capsicum Annuum.” *Scientific Reports* 8(1):1–9.

Zhao, Lijuan, Yuxiong Huang, Cameron Hannah-bick, Aaron N. Fulton, and Arturo A. Keller. 2016. “NanoImpact Application of Metabolomics to Assess the Impact of Cu (OH) 2 Nanopesticide on the Nutritional Value of Lettuce (Lactuca Sativa): Enhanced Cu Intake and Reduced Antioxidants.” *IMPACT* 3–4:58–66.

Calidad nutraceútica y contenido mineral en leguminosas biofortificadas con Selenio



Montalvo Cruz, Miguel Bernabe; Morales Morales Amelio Eli; Garduño Zepeda Ana María; López Espinosa, Sayani Teresa; De la Cruz Lázaro, Efraín; Sánchez Chávez, Esteban; Márquez Quiroz, Cesar.

9.1 Resumen	161
9.2 Introducción	161
9.3 Metabolismo del Selenio en las plantas	162
9.4 Efectos de la adición de Se a las plantas	163
9.5 Biofortificación de leguminosas	164
9.6 Conclusiones	164
9.7 Agradecimientos	164
9.8 Bibliografía	167

9

Calidad nutraceutica y contenido mineral en leguminosas biofortificadas con Selenio

Montalvo Cruz, Miguel Bernabe; Morales Morales, Amelio Eli; Garduño Zepeda, Ana María; López Espinosa, Sayani Teresa; De la Cruz Lázaro, Efraín; Sánchez Chávez, Esteban; Márquez Quiroz, Cesar.

9.1 RESUMEN

En la actualidad, la deficiencia de microelementos en la dieta humana genera problemas de salud en la población. En este sentido, el selenio es un microelemento esencial y tiene importantes beneficios en los humanos. Las investigaciones realizadas en los últimos años se han enfocado principalmente en cultivos de consumo básico para la población humana, el resultado de la biofortificación ha permitido incrementar la calidad nutracéutica y el contenido de microelementos en los cultivos. En atención a la temática del presente capítulo, se documentó parte de las investigaciones realizadas en leguminosas biofortificadas con selenio, y su efecto en el contenido mineral y calidad nutracéutica. Los estudios realizados demostraron que el selenio estimula la síntesis de proteínas, aminoácidos, compuestos secundarios de nitrógeno, compuestos fenólicos, de igual manera, incrementa la actividad antioxidante, y se asocia con la prolongación de la vida postcosecha. De igual manera, se puede presentar la pérdida de compuestos de selenio al hervir, freír, vaporizar y secar el alimento biofortificado.

Palabras clave: *Glycine max*, *Medicago sativa*, *Vigna* spp.

9.2 INTRODUCCIÓN

El Selenio (Se) es un elemento traza escaso en la corteza terrestre, se recicla con facilidad en la atmósfera y se distribuye en toda la tierra. Su presencia y concentración en el suelo está determinada por el pH, condiciones de óxido-reducción, solubilidad de sales, interacciones biológicas y reacciones cinéticas (Trejo-Téllez *et al.*, 2012).

La concentración de Se en los suelos agrícolas oscila entre 0.005 y 3.5 mg kg⁻¹, con un promedio general de 0.2 mg kg⁻¹ (Alloway, 2013); por lo contrario, en suelos seleníferos su

concentración fluctúa de 5 a 1200 mg kg⁻¹ (Kaur *et al.*, 2014). La persistencia y forma predominante de este oligoelemento en el suelo está determinada por su geología, condiciones climáticas, vegetación, pH, y presencia de microorganismos (Fordyce, 2013; Jones *et al.*, 2017).

De manera similar al azufre (S), el Se puede existir en cinco estados de oxidación, estas formas de oxidación determinan su solubilidad y su disponibilidad (Trejo-Téllez *et al.*, 2012). El Se orgánico (Se²⁻), selenito (Se⁴⁺) y selenato (Se⁶⁺) son solubles en agua, y a su vez son las formas más disponibles para la planta (Trejo-Téllez *et al.*, 2012). El selenito está presente principalmente en suelos óxicos, en tanto que, el selenato está presente en suelos de humedales anóxicos (Perrone *et al.*, 2015). Al respecto, Spadoni *et al.* (2007), mencionan que el selenito es menos móvil que el selenato, y sobre todo que pueden tener interacción con otros elementos trazas en el suelo (Fe y Mn), lo que limita la disponibilidad del elemento.

Por otra parte, la deficiencia de Se en los suelos está presente en 40 países de diversas partes de África, América, Asia, Europa y Oceanía (Pilon-Smits, 2015); en tanto que, los suelos seleníferos se extienden principalmente en países como EE.UU, Canadá, Colombia, Venezuela, Australia, India, Irlanda, China y Rusia (Fordyce, 2013; Perrone *et al.*, 2015).

La carencia de Se en los alimentos provoca deficiencias y patologías en el ser humano, afectando a más de un billón de habitantes en todo el mundo (Nothstein *et al.*, 2016); ya que, este elemento es indispensable como cofactor de diversas enzimas, interviene en la síntesis de hormonas en la tiroides, en la síntesis del ADN, en el funcionamiento muscular, entre otros (Das *et al.*, 2018; Puccinelli *et al.*, 2017).

Como ejemplo de los trabajos publicados se puede señalar que, al realizar una búsqueda de referencias con el motor “Google Académico”, y las expresiones “selenium” y “legumes”, también usando el operador booleano “AND” entre ellos, se registraron 23,200 vínculos con documentos inherentes a este tema. El ejercicio anterior se realizó como soporte para justificar el por qué en el presente documento se aborda el problema emergente de la deficiencia de selenio en las leguminosas.

9.3 METABOLISMO DEL SELENIO EN LAS PLANTAS

Existe semejanza en el comportamiento químico de compuestos orgánicos de Se y su contraparte con el S, sin embargo los compuestos orgánicos de Se tienen diferente estabilidad, propiedades y reacción (Back, 2011). El selenito es absorbido por la planta por medio de transportadores de fosfatos y acuaporinas, por el contrario, el selenato es absorbido por la planta por medio de transportadores de sulfatos (Li *et al.*, 2008), ambos procesos de absorción son por transporte activo (Schiavon y Pilon-Smits, 2017a).

Una vez que el selenato es absorbido por las plantas es transportado a los plastidios o puede permanecer en el citoplasma, donde es asimilado por la vía de asimilación del S (Terry *et al.*, 2000; Van Hoewyk *et al.*, 2008). En esta ruta de asimilación el selenato es activado por la ATP sulfurilasa (ATPS) para formar adenosin 5'fosfoselenato (APSe), que se reduce a selenito en presencia de adenosin 5'fosfosulfato (APS) reductasa y posteriormente a seleniuro a través de una vía no enzimática en presencia de glutatión (Schiavon y Pilon-Smits, 2017b). El seleniuro se asimila en SeCis y SeMet, estos seleno aminoácidos se incorporan a las proteínas de forma no específica y pueden causar toxicidad a la planta (Schiavon y Pilon-Smits, 2017b). Los seleno aminoácidos también pueden

ser eliminados mediante la volatilización al convertirse en dimetilselenuros (Ellis y Salt, 2003), siendo el principal producto de la fitovolatilización. En las plantas acumuladoras, la SeCis es metilada y se convierte en dimetildiselenuros para ser volatilizado (Terry *et al.*, 2000); asimismo, otro mecanismo de detoxificación de Se es a través de la formación de Se elemental (Gonzalez-Morales *et al.*, 2017).

Cuando los seleno aminoácidos se incorporan inadvertidamente en proteínas, en sustitución de cisteína y metionina, la función de la proteína se afecta, y por lo tanto puede existir una toxicidad (Malagoli *et al.*, 2015). La mayoría de las plantas pueden metabolizar SeMet en dimetilselenuros, que puede ayudar a evitar la toxicidad (Terry *et al.*, 2000). Otro mecanismo potencial de detoxificación de Se en las plantas es la conversión de SeCys a selenio elemental y alanina (Van Hoewyk *et al.*, 2008). Tanto la volatilización y el desglose de SeCys son inespecíficos, utilizando enzimas que funcionan en el metabolismo del S (Terry *et al.*, 2000; Van Hoewyk *et al.*, 2008). Algunas plantas pueden ser capaces de discriminar entre los análogos Se y S, estas plantas pueden, por ejemplo, metilar SeCys en metil-SeCys, que sirve como mecanismo eficaz de desintoxicación de Se ya que el metil-SeCys no se incorpora en proteínas (Malagoli *et al.*, 2015). Este proceso de metilación está mediado por la enzima SeCys metiltransferasa (SMT). Los taxones vegetales más conocidos que contienen esta enzima son las denominadas plantas acumuladoras de Se, sin embargo, también se ha encontrado SMT en el brócoli (*Brassica oleracea* L.), y metil-SeCys en especies de *Allium* (Gonzalez-Morales *et al.*, 2017).

Por otra parte, se ha reportado que la adición de Se incrementa el crecimiento de los vegetales y la acumulación de carbohidratos en el cloroplasto (Mozafariyan *et al.*, 2017); además,

en un estudio realizado en *Arabidopsis thaliana* se encontró que el ácido jasmónico y el etileno reguló una respuesta de defensa a la acumulación de Se (Van Hoewyk *et al.*, 2008).

9.4 EFECTOS DE LA ADICIÓN DE Se A LAS PLANTAS

Los principales estudios se han realizado en cultivos de interés (Bañuelos *et al.*, 2015; Becvort-Azurra *et al.*, 2012; Castillo-Godina *et al.*, 2013; Castillo-Godina *et al.*, 2016a; Castillo-Godina *et al.*, 2016b; Hermosillo-Cereceres *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2014). En algunas especies agrícolas, la aplicación foliar de selenito o selenato mejoró la asimilación del compuesto y estimuló el crecimiento (El-Ramady *et al.*, 2016). Incluso, la adición exógena de Se en plantas regula el contenido de agua bajo condiciones de sequía, promueve el crecimiento, aumenta la tolerancia al estrés oxidativo inducido por radiación UV, activa mecanismos antioxidantes y reduce los procesos de senescencia (Cuacua-Temiz *et al.*, 2017). En condiciones de estrés salino, el Se puede detonar el mecanismo antioxidante (superóxido dismutasa, peroxidasa de guayacol y catalasa) (KeLing *et al.*, 2013).

También se emplea la adición de Se a germinados para incrementar el contenido de compuestos bioactivos. Ávila *et al.* (2014), mencionan que se incrementó significativamente la síntesis de selenocisteína y glucosinolatos en los germinados de *Brassica* spp., biofortificados. Posteriormente Arscott y Goldman (2012), aplicaron selenato de sodio en germinados de brócoli (*Brassica oleracea* L.) y cebolla (*Allium cepa* L.). Encontrando que a bajas dosis de selenato ($127 \mu\text{M L}^{-1}$) se incrementaba el contenido de Se en los germinados sin afectar el crecimiento de los mismos. En estudios recientes con germinados de brócoli y mostaza (*Brassica alba* L. Rabenh), Bachiega *et al.* (2016) y Bodnar y Konieczka (2016),

encontraron que el contenido de Se se incrementó significativamente, sin embargo solo los germinados biofortificados con selenito de sodio fueron capaces de convertir el Se inorgánico en seleno aminoácidos (selenometilselenocisteína y selenometionina). Por otra parte, Tyszka-Czochara *et al.* (2016) encontraron que al biofortificar geminados de amaranto (*Amaranthus cruentus* L.) con Se, se incrementó el contenido de betanina.

Por otra parte, Lyons *et al.* (2005b) y Lyons *et al.* (2005a) evaluaron accesiones silvestres, comerciales y poblaciones de trigo cultivados en México y Australia, encontrando que el *Aegilops tauschii* y el centeno (*Secale cereale* L.) almacenaron 42 y 35 % más Se en el grano en comparación con los otros cereales bajo condiciones de campo e hidroponía, respectivamente. Zhao *et al.* (2009) evaluaron 150 líneas de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) y 25 líneas de trigo duro (*Triticum durum* L.), trigo farro (*Triticum dicoccum* L.), trigo espelta (*Triticum spelta* L.) y trigo escaña (*Triticum monococcum* L.), encontrando que no hubo significancia en la concentración de Se en el grano de los trigos harineros y duros; sin embargo, en los trigos farro, escaña y espelta la concentración de Se en el grano fue mayor. Al mismo tiempo, El Mehdawi *et al.* (2018) y Schiavon *et al.* (2015) estudiaron la expresión de transportadores de sulfato/selenato (SULTR) y cuatro enzimas APS en Brasicáceas acumuladoras y no acumuladoras, encontrando que la alta concentración de S no obstaculizó los transportadores SULTR1;2 y SULTR2;1, y las enzimas APS1, 2 y 4 en *Stanleya pinnata*, en comparación con *Brasica juncea*. Por otra parte, Pilon-Smits y LeDuc (2009) mencionan que la sobre expresión de la APS en *B. Juncea* puede incrementar la reducción del selenato, y hasta duplicar la acumulación de Se en tallos y raíces.

9.5 BIOFORTIFICACIÓN DE LEGUMINOSAS

Las leguminosas constituyen una fuente de proteínas, fibra dietética, carbohidratos, vitaminas, fitoquímicos y nutrimentos esenciales en la dieta humana (Murphy *et al.*, 2018). Funes-Collado *et al.* (2013), biofortificaron germinados de lenteja, alfalfa (*Medicago sativa* L.) y soya (*Glycine max* L.) con selenito y selenato de sodio, reportando que el contenido de Se en los germinados está en función del contenido de Se de la dosis usada.

Arscott y Goldman (2012), aplicaron selenato de sodio en germinados de frijol chino (*Vigna radiata* L. Wilczek). Encontrando que a bajas dosis de selenato ($127 \mu\text{M L}^{-1}$) se incrementaba el contenido de Se en los germinados sin afectar el crecimiento de los mismos. Aunado a lo anterior, en el **Cuadro 1** se destacan los resultados más sobresalientes de diversos trabajos de biofortificación con selenio.

En lo referente a la biofortificación genética, Kumar *et al.* (2016) han documentado aspectos relevantes en el cultivo de lenteja (*Lens culinaris* Medik.), principalmente se busca reducir el contenido de fitoquímicos antinutricionales e incrementar el contenido de proteína cruda, microelementos, carbohidratos prebióticos, folatos y vitamina B9. Asimismo, Thavarajah *et al.* (2017; 2008) estudiaron el potencial genético de genotipos de lentejas cultivados en diferentes localidades, encontrando que la interacción genotipo y ambiente modificaron en hasta 58.3 % la concentración de Se en la semilla.

Lu *et al.* (2018) documentó la pérdida de compuestos de selenio al hervir, freír, vaporizar y obtener de leche de soya biofortificada. Al respecto, Wan *et al.* (2018) sugieren implementar procesos agroalimentarios para no

alterar el contenido de Se en los alimentos (Figura 1).

9.6 CONCLUSIONES

Esta revisión resalta el efecto que tiene el Se en los cultivos agrícolas, en especial las leguminosas. La biofortificación con Se estimula la síntesis de proteínas, aminoácidos, compuestos secundarios de nitrógeno, compuestos fenólicos, de igual manera, incrementa la actividad antioxidante y prolonga la vida poscosecha. Además, se requieren más estudios acerca de los métodos de procesamiento de los productos biofortificados con Se para disminuir su pérdida durante la cocción, vaporización, freído y secado del alimento biofortificado.

9.7 AGRADECIMIENTOS

Al Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP), proyecto UJAT-PTC-252.

Cuadro 1 • Efecto de la aplicación de Se en leguminosas

Cultivo	Resultado observado	Referencia
Chícharo (<i>Pisum sativum</i> L.)	La aplicación foliar de 25 y 50 mg L ⁻¹ de selenato de sodio modificó positivamente el tiempo de germinación, contenido de clorofila y longitud de la raíz.	(Žitná <i>et al.</i> , 2018)
Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	La doble aplicación foliar de 10 mg Se L ⁻¹ incrementó en 233 % el contenido de Se en la semilla de frijol.	(Smrkolj <i>et al.</i> , 2007)
	La adición de 40 µM de selenito de sodio favoreció el incremento de biomasa y mejoró la concentración de Se en la semilla.	(Hermosillo-Cereceres <i>et al.</i> , 2013)
	La biofortificación con 5 µM de selenato de sodio no modificó el contenido nutrimental del frijol.	(de Figueiredo <i>et al.</i> , 2017)
	La adición de 40 µM de selenito de sodio y 20 µM de selenato de sodio favoreció el incremento de las concentraciones de Ca.	(Hermosillo-Cereceres <i>et al.</i> , 2011)
	La adición de 20 µM de selenito de sodio incrementó la actividad enzimática de la super oxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidada.	(Hermosillo-Cereceres <i>et al.</i> , 2014)
Lenteja (<i>Lens culinaris</i> L.)	La concentración de Se osciló entre 425 y 673 µg kg ⁻¹ , de la cual, el 70 % estuvo en forma de SeMe.	(Thavarajah <i>et al.</i> , 2008)
	La adición de selenato incrementó en 44 % el porcentaje de nitrógeno derivado del aire, y en 108 % el contenido de Se en la semilla, en comparación con el testigo.	(Ekanayake <i>et al.</i> , 2017)
Soya (<i>Glycine max</i> L.)	Se incrementó el contenido de Se en partes comestibles.	(Mao <i>et al.</i> , 2014)

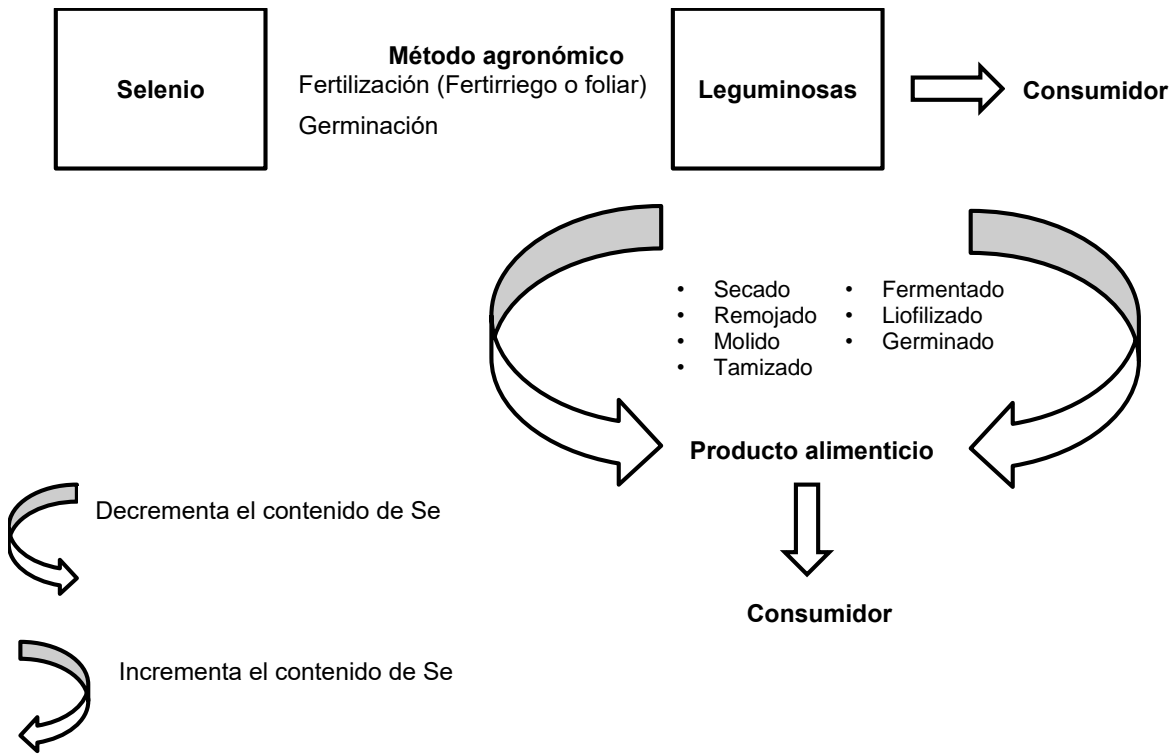


Figura 1 • Esquema representativo de la biofortificación agronómica e industrial para modificar el contenido de Selenio en el alimento de origen vegetal. Modificado de Wan *et al.* (Wan *et al.*, 2018).

9.8 BIBLIOGRAFÍA

- Alloway BJ** (2013). Bioavailability of elements in soil. En: Essentials of medical geology: Revised edition (Eds. Selinus O), pp. 351-373. Dordrecht. Springer Netherlands.
- Arcscott S, Goldman I** (2012). Biomass effects and selenium accumulation in sprouts of three vegetable species grown in selenium-enriched conditions. *Hortscience*, 47: 497-502.
- Ávila FW, Yang Y, Faquin V, Ramos SJ, Guilherme LRG, Thannhauser TW, Li L** (2014). Impact of selenium supply on se-methylselenocysteine and glucosinolate accumulation in selenium-biofortified brassica sprouts. *Food Chemistry*, 165: 578-586.
- Back TG** (2011). Selenium: Organoselenium chemistry. En: Encyclopedia of inorganic and bioinorganic chemistry (Eds. John Wiley & Sons, Ltd.
- Bachiega P, Salgado JM, de Carvalho JE, Ruiz ALTG, Schwarz K, Tezotto T, Morzelle MC** (2016). Antioxidant and antiproliferative activities in different maturation stages of broccoli (*brassica oleracea italica*) biofortified with selenium. *Food Chemistry*, 190: 771-776.
- Bañuelos GS, Arroyo I, Pickering IJ, Yang SI, Freeman JL** (2015). Selenium biofortification of broccoli and carrots grown in soil amended with se-enriched hyperaccumulator *stanleya pinnata*. *Food Chemistry*, 166: 603-608.
- Becvort-Azurra A, Fuentes-Lara LO, Benavides-Mendoza A, Ramírez H, Robledo-Torres V, Rodríguez-Mendoza MN** (2012). Aplicación de selenio en tomate: Crecimiento, productividad y estado antioxidante del fruto. *Terra Latinoamericana*, 30: 291-301.
- Bodnar M, Konieczka P** (2016). Evaluation of candidate reference material obtained from selenium-enriched sprouts for the purpose of selenium speciation analysis. *LWT - Food Science and Technology*, 70: 286-295.
- Castillo-Godina R, Foroughbakhch-Pournavab R, Benavides-Mendoza A** (2013). Efecto del selenio sobre la cuantificación de ácido ascórbico en tomate (*lycopersicon esculentum* mill). *Planta*, 8: 21-23.
- Castillo-Godina RG, Foroughbakhch-Pournavab R, Benavides-Mendoza A** (2016a). Effect of selenium on elemental concentration and antioxidant enzymatic activity of tomato plants. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18: 233-244.
- Castillo-Godina RG, Foroughbakhch-Pournavab R, Benavides-Mendoza A** (2016b). Effect of selenium on elemental concentration and antioxidant enzymatic activity of tomato plants. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18: 233-244.
- Cuacua-Temiz C, Trejo Téllez LI, Velasco-Velasco J, Gómez-Merino FC** (2017). Efecto de los elementos benéficos al, co, se y si en la nutrición de heliconias (*heliconia* sp.). *Agroproductividad*, 10: 62-68.
- Das A, Laha S, Mandal S, Pal S, Siddiqui MW** (2018). Chapter 14 - preharvest biofortification of horticultural crops. En: Preharvest modulation of postharvest fruit and vegetable quality (Eds., pp. 381-434. Academic Press.
- de Figueiredo MA, Boldrin PF, Hart JJ, de Andrade MJB, Guilherme LRG, Glahn RP, Li L** (2017). Zinc and selenium accumulation and their effect on iron bioavailability in common bean

- seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 111: 193-202.
- Ekanayake LJ, Thavarajah D, McGee R, Thavarajah P** (2017). Will selenium fertilization improve biological nitrogen fixation in lentils? *Journal of Plant Nutrition*: 1-10.
- El-Ramady H, Abdalla N, Taha HS, Alshaal T, El-Henawy A, Faizy SEDA, Shams MS, Youssef SM, Shalaby T, Bayoumi Y, Elhawat N, Shehata S, Sztrik A, Prokisch J, Fári M, Domokos-Szabolcsy É, Pilon-Smits EA, Selmar D, Haneklaus S, Schnug E** (2016). Selenium and nano-selenium in plant nutrition. *Environmental Chemistry Letters*, 14: 123-147.
- El Mehdawi AF, Jiang Y, Guignardi ZS, Esmat A, Pilon M, Pilon-Smits EAH, Schiavon M** (2018). Influence of sulfate supply on selenium uptake dynamics and expression of sulfate/selenate transporters in selenium hyperaccumulator and nonhyperaccumulator brassicaceae. *New Phytologist*, 217: 194-205.
- Ellis DR, Salt DE** (2003). Plants, selenium and human health. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 273-279.
- Fordyce FM** (2013). Selenium deficiency and toxicity in the environment. En: *Essentials of medical geology: Revised edition* (Eds. Selinus O), pp. 375-416. Dordrecht. Springer Netherlands.
- Funes-Collado V, Morell-García A, Rubio R, López-Sánchez JF** (2013). Study of selenocompounds from selenium-enriched culture of edible sprouts. *Food Chemistry*, 141: 3738-3743.
- Gonzalez-Morales S, Perez-Labrada F, Garcia-Enciso EL, Leija-Martinez P, Medrano-Macias J, Davila-Rangel IE, Juarez-Maldonado A, Rivas-Martinez EN, Benavides-Mendoza A** (2017). Selenium and sulfur to produce *allium* functional crops. *Molecules*, 22.
- Hermosillo-Cereceres MA, Sánchez-Chávez E, Balandran-Quintana RR, Mendoza-Wilson AM, Guevara-Aguilar A, Muñoz-Márquez E, García-Bañuelos ML** (2011). Ionome variation in bean plant growth under different se forms and application rates. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 9: 374-378.
- Hermosillo-Cereceres MA, Sánchez-Chávez E, Guevara-Aguilar A, Muñoz-Márquez E** (2013). Biofortification and distribution patterns of selenium in bean: Response to selenate and selenite. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 11: 421-426.
- Hermosillo-Cereceres MA, Sánchez E, Muñoz-Márquez E, Guevara-Aguilar A, García-Bañuelos M, D O-B** (2014). Impact of selenium fertilization on the activity of detoxifying enzymes of H_2O_2 in bean plants. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 83: 347-352.
- Jones GD, Droz B, Greve P, Gottschalk P, Poffet D, McGrath SP, Seneviratne SI, Smith P, Winkel LHE** (2017). Selenium deficiency risk predicted to increase under future climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114: 2848-2853.
- Kaur N, Sharma S, Kaur S, Nayyar H** (2014). Selenium in agriculture: A nutrient or contaminant for crops? *Archives of Agronomy and Soil Science*, 60: 1593-1624.
- KeLing H, Ling Z, JiTao W, Yang Y** (2013). Influence of selenium on growth, lipid peroxidation and antioxidative enzyme activity in melon (*cucumis melo* L.) seedlings under salt stress. *Acta*

- Societatis Botanicorum Poloniae: 193–197% V 182.
- Kumar J, Gupta DS, Kumar S, Gupta S, Singh NP** (2016). Current knowledge on genetic biofortification in lentil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64: 6383-6396.
- Li H-F, McGrath SP, Zhao F-J** (2008). Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytologist*, 178: 92-102.
- Lu X, He Z, Lin Z, Zhu Y, Yuan L, Liu Y, Yin X** (2018). Effects of chinese cooking methods on the content and speciation of selenium in selenium biofortified cereals and soybeans. *Nutrients*, 10: 317.
- Lyons G, Ortiz-Monasterio I, Stangoulis J, Graham R** (2005a). Selenium concentration in wheat grain: Is there sufficient genotypic variation to use in breeding? *Plant and Soil*, 269: 369-380.
- Lyons GH, Judson GJ, Ortiz-Monasterio I, Gene Y, Stangoulis JCR, Graham RD** (2005b). Selenium in australia: Selenium status and biofortification of wheat for better health. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19: 75-82.
- Malagoli M, Schiavon M, Dall'Acqua S, Pilon-Smits EAH** (2015). Effects of selenium biofortification on crop nutritional quality. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- Mao H, Wang J, Wang Z, Zan Y, Lyons G, Zou C** (2014). Using agronomic biofortification to boost zinc, selenium, and iodine concentrations of food crops grown on the loess plateau in china. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14: 459-470.
- Mozafariyan M, Pessarakli M, Saghafi K** (2017). Effects of selenium on some morphological and physiological traits of tomato plants grown under hydroponic condition. *Journal of Plant Nutrition*, 40: 139-144.
- Murphy KJ, Marques-Lopes I, Sánchez-Tainta A** (2018). Chapter 7 - cereals and legumes. En: *The prevention of cardiovascular disease through the mediterranean diet* (Eds., pp. 111-132. Academic Press.
- Nothstein AK, Eiche E, Riemann M, Nick P, Winkel LHE, Göttlicher J, Steininger R, Brendel R, von Brasch M, Konrad G, Neumann T** (2016). Tracking se assimilation and speciation through the rice plant – nutrient competition, toxicity and distribution. *Plos One*, 11: e0152081.
- Perrone D, Monteiro M, Nunes JC** (2015). Chapter 1 the chemistry of selenium. En: *Selenium: Chemistry, analysis, function and effects* (Eds., pp. 3-15. The Royal Society of Chemistry.
- Pilon-Smits EAH** (2015). Selenium in plants. En: *Progress in botany: Vol. 76* (Eds. Lüttge U y Beyschlag W), pp. 93-107. Cham. Springer International Publishing.
- Pilon-Smits EAH, LeDuc DL** (2009). Phytoremediation of selenium using transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 20: 207-212.
- Puccinelli M, Malorgio F, Pezzarossa B** (2017). Selenium enrichment of horticultural crops. *Molecules*, 22: 933.
- Schiavon M, Pilon-Smits EAH** (2017a). The fascinating facets of plant selenium accumulation – biochemistry, physiology, evolution and ecology. *New Phytologist*, 213: 1582-1596.
- Schiavon M, Pilon-Smits EAH** (2017b). Selenium biofortification and phytoremediation phytotechnologies: A

- review. *Journal of Environmental Quality*, 46: 10-19.
- Schiavon M, Pilon M, Malagoli M, Pilon-Smits EAH** (2015). Exploring the importance of sulfate transporters and atp sulphurylases for selenium hyperaccumulation—a comparison of *stanleya pinnata* and *brassica juncea* (brassicaceae). *Frontiers in Plant Science*, 6.
- Smrkolj P, Osvald M, Osvald J, Stibilj V** (2007). Selenium uptake and species distribution in selenium-enriched bean (*phaseolus vulgaris* l.) seeds obtained by two different cultivations. *European Food Research and Technology*, 225: 233-237.
- Spadoni M, Voltaggio M, Carcea M, Coni E, Raggi A, Cubadda F** (2007). Bioaccessible selenium in italian agricultural soils: Comparison of the biogeochemical approach with a regression model based on geochemical and pedoclimatic variables. *Science of the Total Environment*, 376: 160-177.
- Terry N, Zayed AM, de Souza MP, Tarun AS** (2000). Selenium in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 401-432.
- Thavarajah D, Abare A, Mapa I, Coyne C, Thavarajah P, Kumar S** (2017). Selecting lentil accessions for global selenium biofortification. *Plants*, 6: 34.
- Thavarajah D, Ruszkowski J, Vandenberg A** (2008). High potential for selenium biofortification of lentils (*lens culinaris* l.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 10747-10753.
- Trejo-Téllez LI, Gómez-Merino FC, G A-G** (2012). Elementos benéficos. En: *Nutrición de cultivos* (Eds. Alcántar-González G y Trejo-Téllez LI), pp. 49-91. México. Colegio de Postgraduados.
- Tyszka-Czochara M, Pasko P, Zagrodzki P, Gajdzik E, Wietecha-Posluszny R, Gorinstein S** (2016). Selenium supplementation of amaranth sprouts influences betacyanin content and improves anti-inflammatory properties via nfkb in murine raw 264.7 macrophages. *Biological Trace Element Research*, 169: 320-330.
- Van Hoewyk D, Takahashi H, Inoue E, Hess A, Tamaoki M, Pilon-Smits EAH** (2008). Transcriptome analyses give insights into selenium-stress responses and selenium tolerance mechanisms in *arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, 132: 236-253.
- Wan J, Zhang M, Adhikari B** (2018). Advances in selenium-enriched foods: From the farm to the fork. *Trends in Food Science & Technology*, 76: 1-5.
- Zhao FJ, Su YH, Dunham SJ, Rakszegi M, Bedo Z, McGrath SP, Shewry PR** (2009). Variation in mineral micronutrient concentrations in grain of wheat lines of diverse origin. *Journal of Cereal Science*, 49: 290-295.
- Žitná M, Juríková T, Hegedúsová A, Golian M, Miček J, Ryant P** (2018). The effect of selenium application on plant health indicators of garden pea (*pisum sativum* l.) varieties. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 66: 399-405.

Biofortificación de Zinc en nogal pecanero

10

Acevedo Barrera, Angélica Anahí; Sánchez Chávez, Esteban; Romero Monreal, Luis; Soto Parra, Juan Manuel; Yañez Muñoz, Rosa María.

10.1	Introducción
10.2	Bibliografía

173
180

10

Biofortificación de Zinc en nogal pecanero

Acevedo Barrera, Angélica Anahí; Sánchez Chávez, Esteban; Romero Monreal, Luis; Soto Parra, Juan Manuel; Yañez Muñoz, Rosa María.

10.1 INTRODUCCIÓN

La deficiencia de Zn ha sido reconocida como la deficiencia de micronutrientes más prevalente y generalizada en el mundo presentándose con mayor fuerza en cultivos establecidos donde los suelos calcáreos de regiones áridas y semiáridas predominan (Pandey *et al.*, 2013; Rafieque *et al.*, 2015). Las condiciones de suelos que más comúnmente dan lugar a una deficiencia de Zn en los cultivos incluyen un alto pH del suelo, baja cantidad de materia orgánica y baja humedad del suelo (Pandey *et al.*, 2013), condiciones que derivan en una baja solubilidad y alta fijación del Zn (Rafieque *et al.*, 2015). Se reporta que en promedio el 30% de los suelos agrícolas en el mundo (Ram *et al.*, 2016) contienen niveles bajos de Zn disponible para la planta lo cual no solo impacta en la reducción del rendimiento del cultivo si no también, en la calidad nutricional que puede aportar al ser humano (Rafieque *et al.*, 2015; De Valença *et al.*, 2017). Por lo tanto, este problema puede ser un factor importante para la aparición generalizada de la deficiencia de Zn en la población, pues el consumo de alimentos es la principal ruta de suministro de Zn en la mayoría de las poblaciones humanas (Poblaciones y Rengel, 2016).

El zinc (Zn) es un nutriente esencial en plantas, animales y seres humanos. En las primeras su deficiencia reduce el crecimiento, la viabilidad del polen, floración y la producción de granos. Respecto a los seres humanos (Poblaciones y Rangel, 2016), en la segunda conferencia internacional FAO/OMS sobre nutrición celebrada en noviembre del 2014, se destacó nuevamente los graves problemas de salud que resultan de su deficiencia los cuales afectan a más de dos millones de personas (Ram *et al.*, 2016). El Zn en humanos resulta ser un problema crítico de nutrición y salud a nivel mundial, debido a que causa varias complicaciones como alteraciones del

crecimiento físico, sistema inmunológico y capacidad de aprendizaje, combinadas con un mayor riesgo de infecciones, daño en el ADN y desarrollo del cáncer (Poblaciones y Rangel, 2016; Manzeke *et al.*, 2017), más específicamente, su deficiencia está relacionada con enfermedades neurodegenerativas, artritis reumatoide, síndrome metabólico, infertilidad, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, asma, enfermedades oculares, diabetes, envejecimiento y enfermedades renales (Pandey *et al.*, 2013; Rafieque *et al.*, 2015) (Figura 1). Se resalta particularmente este elemento debido a que desempeña muchos roles críticos tanto en la nutrición humana como en la producción de cultivos. Como ejemplo, alrededor del 10% de las proteínas en el proteoma humano necesitan Zn para su estabilidad y actividad catalítica, así mismo el Zn está estrechamente involucrado principalmente en la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno y la biosíntesis de proteínas (Ram *et al.*, 2016), por lo que, aumentar la concentración de Zn en semillas, granos y frutos en los cultivos resulta ser una solución ante el desafío de superar la desnutrición humana, especialmente la de los países en desarrollo (Pandey *et al.*, 2013; Rafieque *et al.*, 2015).

Dentro de los frutos que han ganado mayor atención por sus numerosos beneficios para la salud humana están las nueces (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch). Su consumo se ha asociado inversamente con la mortalidad total tanto en hombre como en mujeres, independientemente de otros factores predictivos de muerte, por enfermedades cardíacas, cáncer y enfermedades respiratorias (Alasalvar *et al.*, 2015; Robbin *et al.*, 2015). Aunado a esto, Robbin *et al.*, (2015) mencionan la investigación de Hudthagosol *et al.*, (2011) en la cual reportan que los monómeros de γ -tocoferol y proantocianidina (PAC) flavan-3-ol de nueces eran absorbibles y contribuían a las defensas antioxidantes posprandiales en el

cuerpo humano. El mayor interés en estos frutos se debe en parte a sus componentes lipídicos: ácidos grasos, homólogos de tocoferol, fitoesteroles así como con los beneficios que otorgan sus compuestos fenólicos y contenido PAC (Robbins *et al.*, 2015). Se presume que una porción diaria de nueces, junto con una dieta balanceada, previenen eventos cardiovasculares y posiblemente el desarrollo de otras enfermedades crónicas, como la diabetes tipo II, cáncer, presión arterial alta, enfermedades neurodegenerativas, entre otras (Chang *et al.*, 2016), esto debido a que las nueces son ricas en fitoquímicos que poseen propiedades multifuncionales como actividades antioxidantes, anticancerígenas, efectos antimutagénicos y anti potencial de proliferación. Estos fitoquímicos proporcionan protección contra los radicales libres dañinos y pueden reducir el riesgo de enfermedades no transmisibles asociadas con el estrés oxidativo. Por lo tanto, la inclusión de fitoquímicos bioactivos de los coproductos de nueces en la dieta diaria puede proporcionar fuentes económicas de antioxidantes naturales para usar como ingredientes funcionales y nutraceuticos (Chang *et al.*, 2016). Sin embargo la producción de nogal pecanero se ve fuertemente afectada debido, entre otros aspectos, a las deficiencias y desbalances nutrimentales lo que encarece su manejo (Soto-Parra *et al.*, 2016).

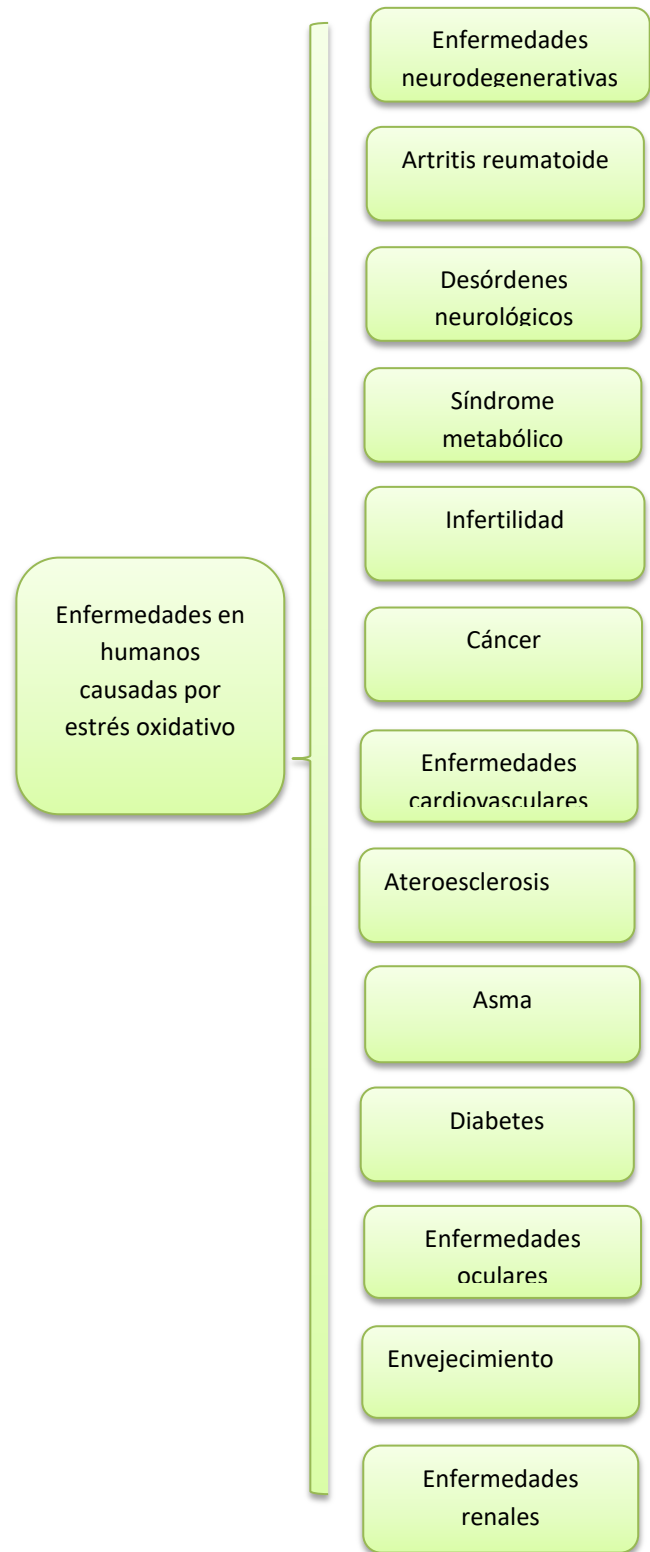


Figura 1 • Enfermedades en humanos causadas por estrés oxidativo

10.1.1 Contenido nutricional de la nuez

Las nueces son ricas en grasas, con un rendimiento neto de alrededor de 58.1–66.18 g de aceite / 100 g de nuez (Atanasov *et al.*, 2018). Dentro de estas los lípidos se encuentran entre 60 y 72% de su peso seco. Entre los lípidos, las nueces contienen una alta concentración de ácidos grasos insaturados principalmente oleicos y linoleicos, estos segundos superando el 50% de los lípidos totales contenidos en la nuez. En estos frutos también se encuentran concentraciones importantes de proteínas de alta calidad, ya que muestran una alta digestibilidad y concentración de aminoácidos esenciales (Rabadan *et al.*, 2019).

Las nueces también son una fuente dietética de alfa-tocoferol (12.2 ± 3.2 mg / g), gamma-tocoferol (168.5 ± 15.9 mg / g), escualeno (151.7 ± 10.8 mg / g) los cuales ayudan a prevenir la oxidación de los ácidos grasos insaturados, que son especialmente propensos al proceso de oxidación por la presencia de enlaces insaturados en su estructura (Atanasov *et al.*, 2018), beta-sitosterol (1572.4 ± 41.0 mg / g de aceite), campesterol (52.2 ± 7.1 mg / g de aceite) y estigmasterol (340.5 ± 29.5 mg / g de aceite). Así mismo aportan tiamina, folato, niacina, fibroblavina y vitamina B6; minerales como calcio, hierro, magnesio, fósforo y zinc (Atanasov *et al.*, 2018).

10.1.2 Rol del Zinc en la defensa antioxidante

Dentro de los minerales que participan en el sistema de defensa antioxidante como activador enzimático se encuentra el Zn. Este elemento se distribuye ampliamente en las plantas como componente de la SOD, enzima primaria de defensa. Además de ser constituyente de metaloenzimas, el Zn brinda protección contra el estrés oxidativo al inducir la señalización del

estrés celular para estabilizar las proteínas y hacerlas menos propensas a la oxidación (Pandey *et al.*, 2013; Pandey y Pandey-Rai, 2015).

10.1.3 Zinc en el suelo

La capacidad de las plantas superiores de absorber Zn depende mucho más de su biodisponibilidad del suelo que de las concentraciones absolutas en el suelo, debido a que la disponibilidad está regulada por diversas propiedades físicas y químicas del suelo (Kumar *et al.*, 2016).

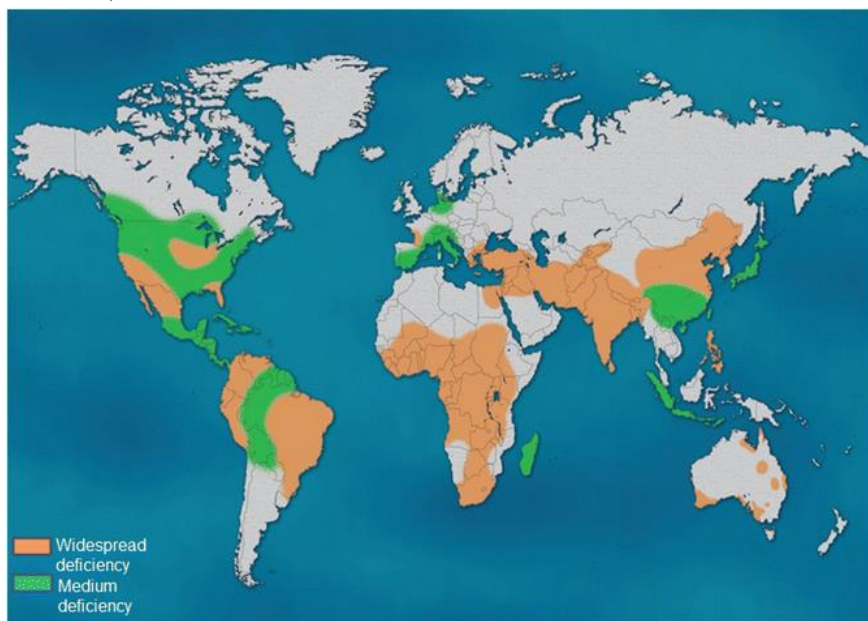
Según la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), aproximadamente el 30% de los suelos cultivables del mundo contienen bajos niveles de Zn disponible para las plantas, encontrándose en los spodosoles y luvisoles las concentraciones más bajas, $28 \mu\text{g g}^{-1}$ y $35 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente, y en los fluvisoles e histosoles las concentraciones más altas, $60 \mu\text{g g}^{-1}$ y $58 \mu\text{g g}^{-1}$ correspondientemente (Hafeez *et al.*, 2013). Sin embargo se registra solamente $<1\text{mg/kg}$ del total del Zn presente en el suelo de manera disponible para la absorción por las plantas (Noulas *et al.*, 2018).

Los suelos heredan sus elementos traza principalmente de las rocas a través de procesos de meteorización geoquímica y pedoquímica. Además de la composición mineralógica de la materia parental, la cantidad total de Zn presente en el suelo también depende del tipo, intensidad de la intemperie, clima y algunos otros factores predominantes durante el proceso de formación del suelo (Hafeez *et al.*, 2013). Sin embargo, las principales causas de la deficiencia de Zn en los cultivos son relacionadas con las características del suelo: alta meteorización, áreas semiaridas con suelos calcáreos de alto pH, suelos con textura arenosa y suelos ácidos en varias zonas climáticas; suelos sódicos, baja cantidad de materia orgánica, presencia de nitrógeno, sodio, calcio, magnesio y fosfatos, poca exploración

radicular debido a compactación del suelo o alto nivel de agua y factores climáticos (Alloway, 2008; Hafeez *et al.*, 2013; Sadeghzadeh, 2013; Noulas *et al.*, 2018).

En los suelos alcalino-calcáreos la deficiencia de Zn es particularmente mayor. Estos suelos representan una importante parte para la agricultura en muchos países con climas mediterráneos y los cuales se utilizan comúnmente para la producción de nogal (Noulas *et al.*, 2018). En estos suelos resulta

más común la deficiencia de Zn debido a que la concentración de este elemento en la solución disminuye de 10^{-4} M ($6.5 \mu\text{g g}^{-1}$) a 10^{-10} M ($0.007 \mu\text{g L}^{-1}$) con un aumento de pH de 5 a pH 8, así mismo el Zn suele precipitar como $\text{Zn}(\text{OH})_2$ y ZnCO_3 en suelos con estas características, por lo que los más altos contenidos de carbonatos en suelos alcalinos absorben Zn y lo mantienen en forma no intercambiable impidiendo el transporte de Zn de la raíz al brote (Hafeez *et al.*, 2013).



Deficiencia mundial de Zn en suelos (Das y Green, 2016).

Desde la solución del suelo, la absorción de Zn depende principalmente de las concentraciones de iones en la superficie de la raíz, la demanda de la planta y la capacidad de absorción de la raíz. El flujo de masa, la difusión y los me

10.1.4 Toma del Zn por las plantas

Las raíces absorben el zinc de la solución del suelo, principalmente en forma de iones Zn^{2+} o complejos con quelatos de ácidos orgánicos, y se translocan a través del xilema a la parte superior de la planta. La transferencia del zinc del suelo desde la raíz se realiza mediante los transportadores de proteínas de metales pesados

de la familia ZIP (Transportador Regulador de Zinc - Transportador Regulador de Hierro como Proteína)

La absorción de Zn desde el suelo depende de las concentraciones de iones en la superficie de la raíz, la demanda de la planta y la capacidad de absorción de la raíz. Zn llega a la superficie de la raíz de la planta a través de los mecanismos de flujo de masa, difusión e intercepción de la raíz.

El flujo masivo es el transporte pasivo de nutrientes desde el suelo a las raíces y es impulsado por la transpiración. Cuando la solución que se mueve a través del suelo hacia

la raíz contiene una concentración relativamente grande de Zn, el flujo de masa se convierte en el mecanismo dominante que lleva a Zn a la superficie de la raíz.

Cuando la concentración de Zn es baja, particularmente en suelos con Zn bajo disponible para la planta, la difusión juega un papel importante en el transporte de Zn, a la superficie de la raíz porque el flujo de masa puede solo llevar una pequeña fracción de los nutrientes requeridos por las plantas. En contraste con el flujo masivo, la difusión opera solo en el volumen inmediato de suelo que rodea una raíz.

La intercepción de nutrientes por parte de las raíces es un importante mecanismo de captación de nutrientes inmóviles en el suelo, como Zn. Por lo tanto, la intercepción de la raíz (es decir, el crecimiento de la raíz y el área de la superficie de la raíz) también es un factor importante para determinar la disponibilidad de Zn en la planta. La mala intercepción de la raíz puede limitar la absorción de Zn si los gránulos de ZnSO₄ están en bandas en el suelo, particularmente a una baja tasa de aplicación de ZnSO₄ (Sadeghzadeh, 2013).

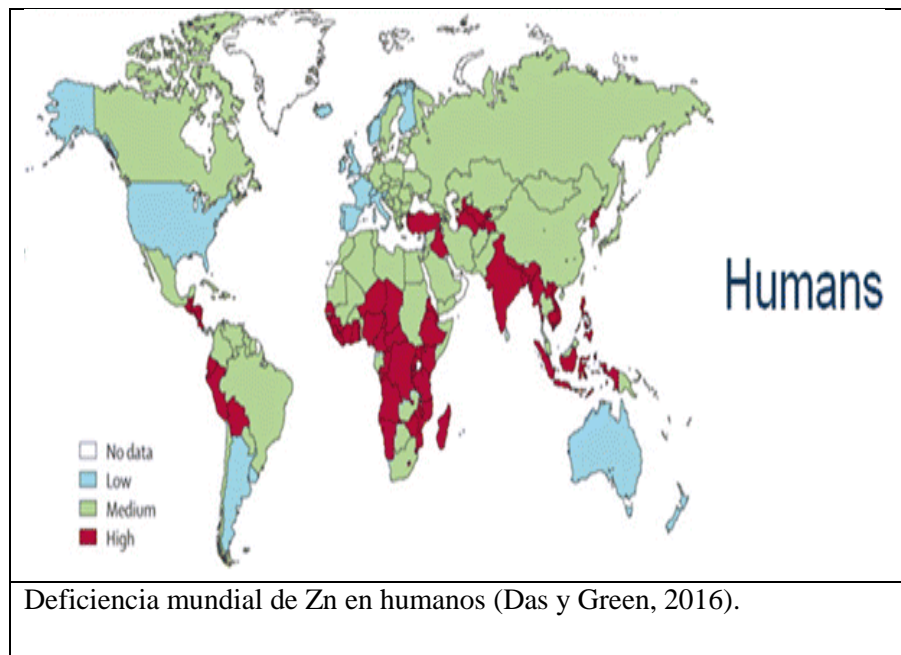
10.1.5 Función del Zn en las plantas

El Zn desempeña un papel clave en las plantas como constituyente estructural o cofactor regulador de una amplia gama de enzimas y proteínas, esto relacionado con el metabolismo

de los carbohidratos, tanto en la fotosíntesis como en la conversión de los azúcares en almidón, metabolismo de las proteínas, de las auxinas, formación del polen, mantenimiento de la integridad de las membranas biológicas y la resistencia a la infección por ciertos patógenos (Dass y Green, 2016). En general, se reconoce que el Zn se transporta en las plantas como Zn²⁺ o unido a ácidos orgánicos. Con un pH alto del suelo, probablemente también se toma como catión monovalente (ZnOH⁺) (Noulas *et al.*, 2018). Por su propiedad activa no redox combinada con su geometría lo hace un cofactor adecuado para una amplia variedad de enzimas involucradas en la transcripción de ADN, proteínas, ácido nucleico, carbohidratos y metabolismo de los lípidos. Además, el Zn es fundamental para el control de la transcripción de genes y la coordinación de otros procesos biológicos reguladores de proteínas (Bashir *et al.*, 2012).

10.1.6 Función del Zinc en humanos

El Zn es un nutriente esencial para la salud humana. El cuerpo adulto contiene 2-3 g de Zn distribuido por órganos, tejidos, huesos, fluidos y células. Para el año 2016 la deficiencia de Zn se encontraba en el quinto lugar dentro de las causas de muerte y enfermedad en el mundo en desarrollo, registrando aproximadamente 800,000 muertes anuales debido a su carencia, de las cuales 450,000 correspondieron a niños menores de 5 años (Das y Green, 2016).



Se estima que en humanos 2800 - 3000 proteínas contienen grupo protésico Zn. Este microelemento es el único metal involucrado en las seis clases de enzimas; Oxidoreductasas, transeferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. Además de esto, el Zn se requiere para la activación de más de 300 enzimas. Los iones Zn también son neurotransmisores y están presentes en las células de las glándulas salivales, las próstatas y el sistema inmunológico. Zn desempeña un papel clave en el crecimiento y desarrollo físico, el funcionamiento del sistema inmunitario, la salud reproductiva, las funciones sensoriales y el desarrollo neuroconductual. Zn es un componente integral de las proteínas de dedos de zinc que regulan la transcripción de DNA. Zn es un nutriente de tipo 2, que se debe a que su

concentración en la sangre no aumenta en proporción al grado de deficiencia. Como resultado, el crecimiento físico se ralentiza y la excreción se reduce la edad de crecimiento lineal: bajo aumento de peso, diarrea, anorexia y nuevos trastornos de comportamiento se observan durante la infancia, mientras que los cambios en la piel, blefarconjuntivitis y enanismo son frecuentes entre los niños pequeños y escolares. Las manifestaciones comunes de la deficiencia de Zn en los ancianos incluyen hipoguesia (sensibilidad al gusto del implante), úlceras crónicas que no sanan, infecciones recurrentes y resultados adversos del embarazo. Zn también es esencial para regular la absorción intestinal de Fe, y una cantidad suficiente de Zn junto con Fe en el cuerpo humano es crucial para tratar la anemia por deficiencia de Fe (Prasad *et al.*, 2014).

10.1.7 Biofortificación de Zn

En la actualidad, solo las deficiencias de Fe y Zn en humanos han surgido a nivel mundial (Prasad *et al.*, 2014) por lo que la biofortificación de cultivos mediante prácticas agronómicas se considera una estrategia que conduce a un aumento del rendimiento y la calidad nutritiva del cultivo a corto plazo (Zhang *et al.*, 2011; económica para la deficiencia de micronutrientes en humanos.

La biofortificación es el aumento de la densidad de nutrientes biodisponibles en las partes de interés comestible de un cultivo mediante técnicas genéticas (Norouzi *et al.*, 2014) las cuales implican ingeniería genética o reproducción clásica (De Valença *et al.*, 2017) o bien, técnicas agronómicas. Esta última se logra mediante la aplicación de fertilizantes con micronutrientes en el suelo y/o la aplicación foliar directamente a las hojas del cultivo (Norouzi *et al.*, 2014; De Valença *et al.*, 2017).

La biofortificación de plantas de alimentos básicos se considera una estrategia prometedora para mejorar el estado de Zn en los cultivos (Khoshgoftarmanesh *et al.*, 2017).

Norouzi *et al.*, 2014; Prasad *et al.*, 2014; Singh, 2016). Velu *et al.*, (2014) mencionan la iniciativa de Harvest Plus del consorcio CGIAR donde trabajan con socios nacionales e internacionales para suprimir las deficiencias de estos minerales mediante la biofortificación de los cultivos. Estos mismos consideran la biofortificación como la solución más

10.2 BIBLIOGRAFÍA

- Das, S., Green, A.**, 2016. Zinc in Crops and Human Health. In *Biofortification of Food Crops*. Springer, New Delhi. 31-40.
- De Valença, A. W., Bake, A., Brouwer, I. D., Giller, K. E.**, 2017. Agronomic biofortification of crops to fight hidden hunger in sub-Saharan Africa. *Global food security* 12, 8-14.
- Khoshgoftarmansh, A. H., Norouzi, M., Afyuni, M., Schulin, R.**, 2017. Zinc biofortification of wheat through preceding crop residue incorporation into the soil. *European Journal of Agronomy* 89, 131-139.
- Kumar, L., Meena, N. L., Singh, U.**, 2016. Zinc transporter: Mechanism for improving Zn availability. In *Biofortification of Food Crops*. Springer, New Delhi. 129-146.
- Noulas, C., Tziouvalekas, M., Karyotis, T.**, 2018. Zinc in soils, water and food crops. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 49, 252-260.
- Manzeke, M. G., Mtambanengwe, F., Nezomba, H., Watts, M. J., Broadley, M. R., & Mapfumo, P.**, 2017. Zinc fertilization increases productivity and grain nutritional quality of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) under integrated soil fertility management. *Field Crops Research* 213, 231-244.
- Pandey, N., Gupta, B., Pathak, G. C.**, 2013. Enhanced yield and nutritional enrichment of seeds of *Pisum sativum* L. through foliar application of zinc. *Scientia horticulturae* 164, 474-483.
- Poblaciones, M. J., Rengel, Z.**, (2016). Soil and foliar zinc biofortification in field pea (*Pisum sativum* L.): Grain accumulation and bioavailability in raw and cooked grains. *Food chemistry* 212, 427-433.
- Prasad, R., Shivay, Y. S., Kumar, D.**, 2014. Agronomic biofortification of cereal grains with iron and zinc. In *Advances in Agronomy* 125, 55-9.
- Rabadán, A., Álvarez-Ortí, M., Pardo, J. E.**, 2019. A comparison of the effect of genotype and weather conditions on the nutritional composition of most important commercial nuts. *Scientia Horticulturae* 244, 218-224.
- Rafique, E., Yousra, M., Mahmood-Ul-Hassan, M., Sarwar, S., Tabassam, T., Choudhary, T. K.**, 2015. Zinc application affects tissue zinc concentration and seed yield of pea (*Pisum sativum* L.). *Pedosphere* 25(2), 275-281.
- Ram, H., Rashid, A., Zhang, W., Duarte, A. P., Phattarakul, N., Simunji, S., Mahmood, K.**, 2016. Biofortification of wheat, rice and common bean by applying foliar zinc fertilizer along with pesticides in seven countries. *Plant and soil* 403(1-2), 389-401.
- Robbins, K. S., Gong, Y., Wells, M. L., Greenspan, P., Pegg, R. B.**, 2015. Investigation of the antioxidant capacity and phenolic constituents of US pecans. *Journal of Functional Foods* 15, 11-22.
- Singh, J.**, 2016. Biofortification of Food Legumes and Bioavailability of Nutrients. In *Biofortification of Food Crops*. Springer, New Delhi 51-60.
- Soto Parra, J. M., Piña Ramírez, F. J., Sánchez Chávez, E., Pérez Leal, R., Basurto Sotelo, M.**, 2016. Alternativas orgánicas para disminuir la aplicación de nitrógeno en nogal pecanero. *Nova scientia* 8(16), 140-161.
- Velu, G., Ortiz-Monasterio, I., Cakmak, I., Hao, Y., Singh, R. P.**, 2014. Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat. *Journal of Cereal Science* 59(3), 365-372.
- Zhang, Y. Q., Sun, Y. X., Ye, Y. L., Karim, M. R., Xue, Y. F., Yan, P., Meng, Q-F.**

Cui, Z-L., Cakmak, I., Zhang, F-S., Zou, C-Q., 2011. Zinc biofortification of wheat through fertilizer applications in different locations of China. Field Crops Research 125, 1-7.

Aplicaciones del Quitosano como bioestimulante y promotor de la nutrición en el cultivo de cereales



Reyes Pérez, Juan José; Enríquez Acosta, Emmanuel Alexander; Ramírez Arrebato, Miguel Angel; Rodríguez Pedroso, Aida Tania; Lara Capistrán, Liliana; Hernández Montiel, Luis Guillermo.

11.1	Resumen	185
11.2	Introducción	185
11.3	Acción bioestimulante del Quitosano en el crecimiento de las plantas	186
11.4	Potenciación de las relaciones simbióticas beneficiosas plantas-microorganismos	188
11.5	Nutrición de las plantas y la fertilidad del suelo	190
11.6	Conclusiones	191
11.7	Bibliografía	192

11

Aplicaciones del Quitosano como bioestimulante y promotor de la nutrición en el cultivo de cereales

Reyes Pérez, Juan José; Enríquez Acosta, Emmanuel Alexander; Ramírez Arrebato Miguel Ángel; Rodríguez Pedroso, Aida Tania; Lara Capistrán, Liliana; Hernández Montiel, Luis Guillermo.

11.1 RESUMEN

El quitosano es un compuesto de origen natural con propiedades promotoras de la nutrición, el crecimiento y rendimiento de los cereales, por lo que se ha considerado como un bioestimulante. Sus particulares mecanismos de acción le permiten actuar como regulador del crecimiento, acelerador de la germinación de las semillas, el vigor de las plantas, y el rendimiento agrícola. Además, favorece el crecimiento y desarrollo de microorganismos beneficiosos que establecen relaciones simbióticas con las plantas, tales como las micorrizas o bacterias promotoras del crecimiento. A su vez, incrementa la microbiota y la actividad microbiana en el suelo, lo que mejora la disposición de nutrientes y su absorción por la planta. Las numerosas evidencias de su actividad biológica lo convierten en una alternativa viable para la producción agrícola más amigable con el ambiente.

Palabras clave: Bioproducto, bioestimulante, quitosano, cereales.

11.2 INTRODUCCIÓN

En la actualidad la búsqueda de materiales menos agresivos con el medio ambiente es una tarea continua en todas las áreas del quehacer humano debido a los altos niveles de contaminación presentes en todo el planeta. En la agricultura este trabajo es doblemente complicado, porque, por un lado, se deben producir materiales que logren su efecto específico en la planta o en sus productos, mientras que, por el otro, se necesita que éstos se eliminen sin efectos perturbadores en el medio ambiente (Beltrán *et al.*, 2004).

En tal sentido la aplicación de biofertilizantes y bioestimulantes a los cultivos constituye una estrategia priorizada en la búsqueda de mejorar y/o preservar las condiciones físicas, químicas y biológicas de los suelos y elevar el potencial

agroproductivo (Welbaum *et al.*, 2004). En la agricultura existe una gama de productos bioestimulantes con capacidad para incrementar el crecimiento y el rendimiento de los cultivos (Abu-Muriefah, 2013, Brown & Saa 2015).

Se define un bioestimulante como cualquier sustancia o microorganismo aplicado a las plantas con el propósito de estimular la eficiencia de la nutrición, la tolerancia a estreses abióticos y/o la calidad del cultivo con independencia de su contenido de nutrientes. (Du Jardín, 2015). Este mismo autor clasifica los bioestimulantes en diferentes categorías las cuales son: extractos de algas marinas y de plantas, hidrolizados de proteínas y otros compuestos que contienen N, ácidos húmicos y fúlvicos, compuestos inorgánicos, bacterias beneficiosas, hongos beneficiosos, quitosano y otros biopolímeros.

En particular, el quitosano y sus formulaciones han sido ampliamente empleado, por sus potencialidades biológicas, principalmente por poseer actividad antimicrobiana, inducir respuestas defensivas (Ramírez *et al.*, 2010) y tolerancia a estreses abióticos (Guan *et al.*, 2009), además de promover el crecimiento y desarrollo de varias especies (Pichyangkura y Chadchawan, 2015).

Los efectos de estos productos son de especial importancia en los cereales, clasificación en la cual se agrupan gramíneas herbáceas cuyos granos o semillas están en la base de la alimentación humana y/o del ganado. Algunos de los representantes más destacados de este grupo son el trigo, el maíz y el arroz entre otros.

El trigo (*Triticum aestivum*) puede crecer en diversidad de latitudes, climas y suelos, aunque se desarrolla mejor en zonas templadas. Debido a esto, es posible encontrar cosechas de trigo en todos los continentes. El trigo es el primer cereal desde el punto de vista comercial

Por su parte el maíz (*Zea mays*, L.) es uno de los cereales de mayor importancia económica en el mundo, ocupando el segundo lugar después del trigo (*Triticumaestivum*, L.), con una producción global de unos 500 millones de toneladas. Directa o indirectamente, constituye el alimento del 15 al 20 % de la humanidad, y se cultiva en más de 70 países, cubriendo un área superior a los 120 millones de hectáreas, siendo además el cultivo más repartido en todo el mundo, al cultivarse en los cinco continentes, aunque su zona fundamental es el continente americano (FAO, 2015). Este cultivo juega un papel muy importante en lo referente a seguridad alimentaria, por su gran valor nutritivo, aportando proteínas, carbohidratos, grasas, hierro, potasio, magnesio y vitaminas tales como retinol, tiamina, niacina, vitamina C y ácido fólico, elementos necesarios para una dieta saludable

Por su parte, el arroz es el alimento básico de dos terceras partes de la población mundial. En el año 2016 se produjeron en el mundo alrededor de 740,1 millones de toneladas anuales de arroz en cáscara en unos 160 millones de hectáreas de tierra (FAO, 2018)

Respecto a la actividad del quitosano en los cereales está muy influenciada por su naturaleza química. En ese sentido lo que se conoce por quitosano es el derivado mayormente desacetilado (más de un 70%) de la quitina, que es el segundo polisacárido más abundante de la naturaleza después de la celulosa. Esta quitina es insoluble en la mayoría de los disolventes conocidos pero por una reacción de eliminación parcial de sus acetilos (desacetilación) se convierte en quitosano que es soluble en disoluciones ligeramente ácidas. De esta forma realmente el quitosano es una familia de compuestos cuyas principales propiedades químicas son el grado de acetilación y de polimerización. (Ramírez et al., 2017)

El quitosano tiene propiedades muy útiles para la agricultura. Se disuelve en disoluciones ácidas diluidas, lo cual permite variadas formas de aplicación por ejemplo directamente al suelo, por tratamiento a las semillas, vía foliar entre otras. Su naturaleza polimérica le permiten formar películas semipermeables a los gases sobre las hojas y las semillas a las cuales se aplica, permitiendo un uso más eficiente del agua y promoviendo procesos vitales para los cereales como la germinación y la fotosíntesis.

Se entiende que el incremento de la producción de los cereales es una cuestión de suma importancia para la humanidad. Por lo tanto, la aplicación de un producto como el quitosano es una alternativa muy atractiva en las actuales condiciones productivas. En este sentido en este capítulo se discute la aplicación de quitosano como bioestimulante en los cereales y su acción como promotor de las asociaciones simbióticas con las plantas.

11.3 ACCIÓN BIOESTIMULANTE DEL QUITOSANO EN EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS

La aplicación del quitosano y sus derivados provoca cambios favorables en el metabolismo de las semillas y las plantas. Sin embargo esta actividad está muy influenciada por la naturaleza química del quitosano. Así, se ha demostrado que la aplicación de quitosano a las semillas de cereales acelera la germinación y el vigor de las plántulas resultantes. Específicamente se ha reportado que el recubrimiento de semillas con quitosano aumentó el rendimiento del arroz y el trigo en condiciones de campo en más del 20%, por lo que se patentó su introducción a escala comercial desde hace algún tiempo (Hadwiger, 1994)

En ese sentido se ha demostrado que este biopolímero influye favorablemente en la

germinación de los cultivos como el trigo y arroz (Hadwiger, 2013) así como en las hortalizas (Pichyangkura&Chadchawan, 2015) También se ha informado que la aplicación de quitosano a la semilla a concentración de 100 mg.L⁻¹ mejora la germinación del arroz incluso en condiciones de salinidad, lo cual se ha relacionado porque favorece la producción de sustancias antioxidantes. Además su aplicación contraresta los efectos de estrés abiótico que puede sufrir los cultivos por ejemplo en el maíz (Lizárraga et al., 2013)

Respecto a los mecanismos de acción que explican estos efectos se ha planteado que la quitosana estimula la síntesis de giberelinas y de enzimas hidrolíticas en los cereales como la β 1,3 y quitinasas que provocan un mayor y más rápido desdoblamiento de las sustancias de reserva que están en el embrión de la semilla que permiten que se acelere el proceso de germinación y la emergencia del hipocotilo y la radícula (Hirano, 1990).

Por su parte también la aplicación foliar de quitosano se ha demostrado que incrementa significativamente variables del crecimiento y el rendimiento de este tipo de plantas. De esta forma Toan y Hahn(2013) demostraron incrementos del rendimiento medio de 31% en cuatro diferentes variedades de arroz a las cuales se le aplicó quitosano 3 veces en concentraciones entre 10 y 15 mg.L⁻¹. de la producción de clorofila y la fotosíntesis en las plantas, así como el uso más eficiente del agua mediante un cierre estomático (Irritiet *al.* 2009) lo cual pudiera explicar el significativo aumento de la altura y el grosor del tallo de las plantas.

Algunos autores (Salachna y Zawadzińska, 2014) han demostrado que el incremento de los contenidos de clorofila en las hojas está relacionado además, con un aumento en la toma de nutrientes por las raíces de las plantas, la cual

está influido por la concentración de quitosano aplicada. También aumenta la producción de enzimas y otros metabolitos que aceleran el metabolismo celular (Hadwiger, 2013).

Otros autores (Guan et al., 2009) han informado que al tratar semillas de maíz con quitosano de concentración 0,5 % ,se mejora la velocidad de germinación y se incrementa la longitud y la masa seca de la raíz y el tallo de las plantas.

Algunas formulaciones comerciales que contienen quitosano como principio activo en la estimulación del crecimiento vegetal son: Elexa, Biorend,Quitomax entre otras también han sido utilizadas y también han mostrado los efectos beneficiosos en estos cultivos.

En el **Cuadro 1** se muestra un resumen de algunas experiencias en la estimulación del crecimiento y el rendimiento vegetal con el empleo de quitosana.

Cuadro 1 • Algunas experiencia en la estimulación del crecimiento y el rendimiento de cereales con el empleo de quitosano y sus formulaciones

Cultivo	Producto	Tratamiento	Efecto	Referencias
Arroz	Quitosano	Tratamiento a la semilla y al suelo	Mayor número de panículas y mayor rendimiento	Boonlertnirun et al. (2008)
Maíz	Quitomax	Aplicación foliar	Aumento del rendimiento	TorresRodríguez (2018)
Millo perla	Elexa	Tratamiento a la semilla	Incremento en variables del crecimiento	(Sharathchandra et al., 2004)
Arroz(cuatro variedades)	Quitosano	aplicaciones foliares	Aumento del rendimiento medio en 31 %	Toan y Hahn (2013)

11.4 POTENCIACIÓN DE LAS RELACIONES SIMBIÓTICAS BENEFICIOSAS PLANTAS-MICROORGANISMOS

Una alternativa para reducir las dosis de agroquímicos en diferentes cultivos es la utilización de microorganismos que constituyen biofertilizantes. Estos pudieran ser hongos como las micorrizas o bacterias promotoras del crecimiento del género *Rhizobium* que protegen a las plantas hospederas contra los efectos perjudiciales del déficit de agua (Smith et al., 2010; Ruiz-Lozano et al., 2012) además pueden incrementar la disposición o absorción de nutrientes del suelo (Bashri et al., 2018).

Algunos autores han utilizado la quitina y el quitosano en las interacciones simbióticas beneficiosas planta microorganismo (Smith et al., 2010). Se ha sugerido que la adición de

quitina pudiera acelerar el primer paso en el establecimiento de la infección micorrízica, que consiste en la ruptura de la pared celular del hongo mediante las quitinasas vegetales.

Los efectos directos de estos microorganismos biofertilizantes involucran la fijación del nitrógeno atmosférico (Costales et al., 2010) solubilización de minerales (Bashri et al., 2018), síntesis de promotores del crecimiento (Barea et al., 2005), así como la producción de ácido indol-3-acético (AIA) y la colonización de la rizosfera para promover el crecimiento de diversos cultivos agrícolas (Srivastava et al., 2009).

Varios de estos microorganismos benéficos pueden utilizar el quitosano como fuente de carbono y de esta forma incrementan sus poblaciones en respuesta a la aplicación de este producto.

Cuadro 2 • Niveles de poblaciones microbianas en determinadas en los diferentes tratamientos (Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas según Tukey con un error de 0.05%)

Variedad	Grupo Microbiano (UFC)	TRATAMIENTOS			
		Control	QuitoMax	Azofert	Ecomic
Cariaco	Bacterias	68,0 a	68,0 b	89,7 b	47,4 b
	Actinomicetos	22,5 b	226 a	107,4 a	38,0 c
	Hongos	22,4 b	27 c	28,2 c	48,5 a
		EE: 1,6	EE: 2,4	EE: 2,1	EE: 1,7
Chuco	Bacterias	70,65 a	40,0 b	90,45 b	45,6 b
	Actinomicetos	23,85 c	47,40 a	116,8 a	38,0 c
	Hongos	47,50 b	21,90 c	38,9 c	51,25 a
		EE: 1,01	EE: 0,78	EE: 1,3	EE: 1,5

Medias con letras iguales en las columnas no difieren significativamente para $p < 0,05$ según Tukey

En ese sentido en la **Cuadro 2** se presentan los resultados del análisis de las poblaciones de bacterias, actinomicetos y hongos en un experimentos con dos variedades de maíz a las cuales se les aplicó en las semillas los bioestimulantes Quitomax (quitosano con grado de acetilación de 13.7% y 124 kDa de masa molecular (Falcón et al., 2015).), Azofert®, el cual es un inoculante a base de bacterias del género *Rhizobium*, (Nápoles et al., 2016) y Ecomic® inoculante sólido que contiene propágulos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) *Glomus intraradice*.

Se evidencia que en el tratamiento control, para ambas variedades, existe un comportamiento normal de las poblaciones, es decir, existe el predominio de bacterias, seguido de los actinomicetos y por último los hongos con diferencias significativas entre los grupos. En el caso de las bacterias debe considerarse que poseen características nutricionales que le permiten un progreso más acelerado que los otros grupos microbianos. Puede ser considerada

además la hipótesis de que las bacterias sean mayormente estimuladas por el efecto que las raíces ejercen sobre los microorganismos en el suelo, conocido como efecto rizosférico.

Se destaca en la **Cuadro 2** como la aplicación de QuitoMax y Azofert estimula el desarrollo de los actinomicetos con diferencias significativas con respecto a las bacterias y los hongos. En ese sentido, Franco et al. (2008) y destacan que los actinomicetos son bacterias filamentosas, Gram positivas, que se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente, con propiedades quitinolíticas y alto contenido de guanina y citosina en su ADN, característica que los hace morfológicamente diversos entre sí. Sin embargo este grupo se encarga de degradar compuestos orgánicos intermedios y estables y además se ha reconocido que sintetiza ácido indolacético, así como otras hormonas y metabolitos estimulantes del crecimiento de las plantas (Macagnan et al. 2008).

En el caso específico del Quitomax (quitosano) debe tenerse además en consideración que este

biopolímero al llegar al suelo induce la producción de enzimas, quitosanasas y quitinasas por parte de los actinomicetos necesarias para degradarlo y utilizarlo como fuente de carbono a diferencias de otros microorganismos. De esta forma se incrementa esta población con respecto al resto de los microorganismos.

Adicionalmente numerosos autores han hecho referencia a la capacidad de los sustratos para inducir la síntesis de enzimas en los microorganismos, entre ellos Lockwood et al. (2007) destacan que en algunos casos la capacidad inductora del quitosano no sólo puede ser aprovechada para proteger la planta sino que se puede utilizar para incrementar el rendimiento de alguna sustancia comercialmente importante, como algunos metabolitos secundarios.

Respecto a la simbiosis planta-micorrizas y el papel del quitosano. Recientemente se ha encontrado que los hongos micorrizógenos del género *Glomus* también producen lipochitoooligosaccharides los cuales estimulan la formación de estructuras en las raíces en plantas perteneciente a diversas familias incluida los cereales (Maillet al., 2011). Los lipooligosacaridos son fragmentos de quitosano parcialmente acetilados entre 3 y 5 residuos unidos a una larga cadena de ácido graso y una molécula flavonoide que sirve de señalización en las relaciones simbióticas de las leguminosas con bacterias para la fijación biológica el nitrógeno. Sin embargo, los resultados sugieren que tanto las micorrizas y las bacterias comparten mecanismos comunes en su asociación y los lipoquitooligosacaridos juegan un rol muy importante en estos procesos.

11.5 NUTRICIÓN DE LAS PLANTAS Y LA FERTILIDAD DEL SUELO

El quitosano y sus derivados tienen características adicionales en comparación con la mayoría de los carbohidratos. Entre ellas se encuentra el apreciable contenido de nitrógeno en su composición, alrededor del 10 % (Ramirez 2010). Esta propiedad favorece que cuando se adiciona quitosano al suelo se incrementa la población y actividad de microorganismos procariontes y eucariotes fundamentalmente de naturaleza quitinolítica y proteolítica. Ambos aceleran la transformación de materia orgánica e inorgánica y permite que el sistema radical de la planta tenga mayor disponibilidad y absorba más nutrientes desde el suelo.

Algunos de estos microorganismos forman relaciones simbióticas donde las plantas mejoran las condiciones para su nutrición ya que estos se asocian o colonizan las raíces deformándolas y aumentando sus capacidad de absorción de agua y nutrientes. Adicionalmente en esta nuevas rizoferas modificadas se convierten en asimilables elementos nutrientes no disponibles para las raíces no modificadas. En la literatura se encuentran algunos ejemplos de cómo se han utilizado enmiendas de quitosano y fertilizantes para el suministro de nutrientes esenciales en la nutrición de las plantas *en especial como nanoportadores* (Deshpande et al 2017), Algunos ejemplos consisten en nanopartículas de quitosano con cobre aplicadas a la semilla y asperjadas foliarmente por 35 días a plantas de maíz mostraron un incremento en altura, diámetros del tallo contenido de clorofila y del rendimiento respecto al control Choudhary et al., 2017)

Por otra parte nanopartículas de quitosano (GD 85% y MM 60kDa) conteniendo zinc aplicadas foliarmente dos veces por semanas por cinco semanas cubrió la demanda de zinc de plantas

de trigo cultivadas bajo condiciones de deficiencia de este elemento (*Deshpande et al 2017*),

Nanopartículas de quitosano con zinc se usaron para la biofertilización de este metal en grano en plantas de trigo. Sin embargo, con una concentración 10 veces menor para las nanopartículas de quitosano zinc no se observó diferencias significativas en el contenido de zinc en los granos respecto al control tradicional. (Ashwin et al., 2018)

11.6 CONCLUSIONES

El quitosano puede actuar en la nutrición de los cereales de forma directa ó indirecta. La aplicación directa de este biomaterial funciona como bioestimulante promueve el crecimiento y desarrollo vegetal incrementando favorablemente las variables de crecimiento y rendimiento. De forma indirecta promueve el establecimiento de relaciones simbióticas con microorganismos beneficiosos que modifican la rizofera de forma tal que se mejora la toma y disponibilidad de nutrientes del suelo. Adicionalmente el quitosano puede servir de portador y suministrador de microelementos esenciales para las plantas tanto de forma convencional ó en forma de nanopartículas que multiplica la eficiencia en la toma de estos nutrientes.

Indudablemente el uso de este producto ha revolucionado la nutrición de los cereales mediante sustancias amigables con el ambiente.

11.7 BIBLIOGRAFÍA

- AshwinDapkekarParesh Deshpande, Manoj D. Oak, Kishore M. Paknikar Jyutika M. Rajwade.** (2018) Zinc use efficiency is enhanced in wheat through nanofertilization *Scientific Reports* 8:6832 DOI:10.1038/s41598018252475
- Abu-Muriefah, S.** (2013). Effect of chitosan on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown under water stress conditions. *Int. Res. Journal Agric. Sci. Soil Sci.* 3 (6): 192-199.
- Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcón, R. & Azcón, C.** (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, vol. 56, no.417, p. 1761-1778.
- Bashri G., Patel A., Singh R., Parihar P., Prasad S.M.** (2017) Mineral Solubilization by Microorganism: Mitigating Strategy in Mineral Deficient Soil. In: Patra J., Vishnuprasad C., Das G. (eds) *Microbial Biotechnology*. Springer, Singapore DOI https://doi.org/10.1007/978-981-10-6847-8_12
- Beltrán, F.A. & col.,** (2004). Tópicos Selectos de Agronomía. Edit. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. y Universidad Autónoma de Baja California Sur. 260 p.
- Boonlertnirun, S.; Boonraung, C. & Suvanasa, R.** (2008). Application of chitosan in rice production, *Journal of metals, materials and minerals*, vol. 18, no. 2, pp. 47–52, ISSN 1047-4838.
- Brown, P. & Saa, S.** (2015). Biostimulants in agriculture. Mini-Review. *Front. Plant Sci.* 6: 671. doi: 10.3389/fpls.2015.00671.
- Choudhary, R. Kumaraswamy V, Kumari S, Sharma S, Pal A, Raliya R, Saharan V.** (2017) Cu-chitosan nanoparticle boost defense responses and plant growth in maize (*Zea mays* L) *Nature Scientific Reports* vol 7, Article number: 9754.
- Costales, D., Nápoles, M. C. & Falcón, A. B.** (2010). Efecto de derivados de quitosana en la simbiosis *Bradyrhizobium-soya*. *Cultivos Tropicales* 26 (1), 83-87.
- Deshpande, P.; Dapkekar, A.; Oak, M.D.; Paknikar, K.M.; Rajwade, J.M.** Zinc complexed chitosan/TPP nanoparticles: Promising micronutrient nanocarrier suited for foliar application. *Carbohydr. Polym.* 2017, 165,
- Du Jardin, P.** (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation *Scientia Horticulturae* Vol. 196, Pages 3-14
- Falcón, A. B., Costales, D., González-Peña, D. & Nápoles, M. C.** (2015). “Nuevos productos naturales para la agricultura: las oligosacarinas”. *Cultivos Tropicales*, vol. 36, no. supl.1, pp. 111-129, ISSN 0258-5936.
- FAO.** (2015). “Mejoramiento de Maíz con objetivos especiales”. Disponible en: www.fao.org/DOCREP/003/X7650S/x7650s21.com
- FAO** (2018). Anuario estadístico de la FAO, FAOSTAT. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>. Fecha de consulta: 23 de Julio 2018
- Franco, M.** (2009). Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Revista Peruana de Biología.* 16 (2): 239-242
- Guan, Y., Hu, J., Wang, J. & Shao, X.** (2009) Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *Journal of*

- Zhejiang University. Sci., vol. 10, p. 427-433.*
- Hadwiger, L.** (1994): Method for treating cereal crop seed with chitosan to enhance yield, root growth, and stem strength. US patent WO-8901288-A1
- Hadwiger, L.** (2013). “Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype”. *Plant Science, vol. 208*, pp. 42-49, ISSN 0168-9452, DOI 10.1016/j.plantsci.2013.03.007.
- Hirano S, Yamamoto M, Hayashi M, Nishida T, Inui, H** (1990) Chitinase activity in seeds coated with chitosan derivatives *Agric. Biol.Chem.,54, 2719-2720.*
- Irriti M, Picchi V, Rossoni M, Gomarasca S, Ludwing N, Gargano M, Faoro F** (2009) Chitosan antitranspirat activity is due to abscisic acid dependent stomatal closure. *Enviromental and Experimental Botany* 66:493–500.DOI: 10.1016/j.envexpbot.2009.01.004
- Lizárraga, E. G., Torres I., Moreno E. & Miranda S. P.** (2013). “Chitosan application in maize (*Zea mays. L.*) to counteract the effects of abiotic stress at seedling level”. *African Journal of Biotechnology, vol. 10, no. 34*, pp. 6439-6446, ISSN 1684-5315.
- Lockwood, G. B., Bunrathep, S., Songsak, T. & Ruangrunsi, N.** (2007). Production of d-Limonene in Chitosan Elicited Citrus Japonica Suspensión Cultures. *Journal of Essential Oils Research* : 113-116.
- Macagnan, D., Romeiro, R., Pomella, A. & Souza, J.** (2008). Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthoraperniciosa* by phylloplaneactinomycetes. *Biological Control. Brasil. (47): 309 – 314.*
- Maillet, F, Poinso V, André O, Puech-Pagès, V, et al** (2011). Fungallipochitooligosaccharidesymbiotic signals in arbuscularmycorrhiza *Nature. 469(7328):58-63.* doi: 10.1038/nature09622.
- Nápoles, M., Cabrera, C., Onderwater, R., Wattiez, R., Hernández, I., Martínez, L. & Núñez, M.** (2016). Señales en la interacción *Rhizobiumleguminosarum-frijol común (Phaseolus vulgaris L.). Cultivos Tropicales 37 (2): 37-44.*
- Pichyangkura, R. & Chadchawan, S.** (2015). Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Sci. Hort. 196: 49–65.*
- Ramirez, Á, Rodriguez, A. & Alfonso, L.** (2010). Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. *Bioteconología Aplicada v.27 n.4.* pp. 32-47.
- Ramírez, M.A. L. Alfonso, P. González, J.R. Fagundo, M. Suarez, C. Melián, T. Rodríguez, C. Peniche.** (2017) Chitin preparation by demineralizing deproteinized lobster shells with co2 and a cationite *J. Renew. Mater., Vol. 5, No. 1,pp 30-7*
- Ruiz-Lozano, J., Porcel, R., Bárzana, G., Azcón, R. & Aroca, R.** (2012). Contribution of arbuscularmycorrhizal symbiosis to plant drought tolerance. State of the art. En: *Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features.* Ed. R. Aroca. *Springer-Verlag, Heidelberg, Germany*, p. 335-362, ISBN 978-3-642-32652-3.
- Sharathchandra, R. G.; S. N. Raj, N. P. Shetty, K. N. Amruthesh and H. S. Shetty.** (2004). A Chitosan formulation ElexaTM induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet. *Crop Protection 23: 881–888.*

- Salachna P, Zawadzińska, A** (2014). Effect of chitosan on plant growth, flowering and corms yield of potted freesia. *Journal of Ecological Engineering* 15(3): 97–102
DOI: 10.12911/22998993.1110223
- Shrivastava, S. D., Souza, S. & Desai, P.** (2008). Production of indole-3-acetic acid by immobilized actinomycete for soil applications. *Current Science, India.* (94):12.
- Smith, S. E., Facelli, E., Pope, S. & Smith, F. A.** (2010). Plant performance in stressful environments: interpreting new y established knowledge of the roles of arbuscularmycorrhizas. *Plant Soil*, p. 326:3-20.
- Toan , N. & Hahn, T.** (2013). Application of chitosan solutions for rice production in Vietnam. *African J. Biotech.* 12 (4): 382-384.
- Torres-Rodríguez J A, Reyes-Pérez J, González-Gómez L, Jiménez-Pizarro M, Boicet-Fabre T, Enríquez- Acosta A, et al.,** (2018) Respuesta agronómica de dos variedades de maíz blanco (*Zeasmays,L.*) a la aplicación de Quitomax, Azofert y Ecomic. *Biotecnia*, 20(1): 3-7 ISSN 1665-1456. DOI:<http://dx.doi.org/10.18633/biotecnia.v20i1.522>.
- Welbaum, Strug A, Dory Z. Nowak J** 2004
Fertilizing soil microorganism to improve productivity in agroecosystem
CriticRev Plant Sci 23:175-193.

Evaluation of different seaweed extracts and compost on vegetative growth, yield and fruit nutraceutical quality of cucumber (*Cucumis sativus*)

12

Fortis Hernández, Manuel; Preciado Rangel, Pablo; Trejo Valencia, Radames; Acosta Sánchez, Ludy; Gallegos Robles, Miguel Ángel; Vázquez Vázquez, Cirilo.

12.1	Abstrac	197
12.2	Introduction	197
12.3	Materials and Methods	198
12.4	Results and discussion	201
12.5	Conclusions	205
12.6	References	206

12

Evaluation of different seaweed extracts and compost on vegetative growth, yield and fruit nutraceutical quality cucumber (*Cucumis sativus*)

Fortis Hernández, Manuel; Preciado Rangel, Pablo; Trejo Valencia, Radames; Acosta Sánchez, Ludy; Gallegos Robles, Miguel Ángel; Vázquez Vázquez, Cirilo.

12.1 ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the production and phytochemical quality of cucumber fruits (*Cucumis sativus*), in response to the application of different leaf extracts of seaweed. The work was carried out under shadow mesh conditions in the autumn - winter agricultural cycle at Instituto Tecnológico de Torreón, located in Torreón, Coahuila. The experimental design was completely random, considering five treatments with three replicates each. The treatments evaluated were: T1 = *Macrocystis pyrifera*, T2 = *Bryothamnion triquetrum*, T3 = *Ascophyllum nodosum*, T4 = *Grammatophora* sp., T5 = *Macrocystis pyrifera*, and a control treatment (T6) with inorganic fertilization. The substrate used was a mixture of sand and vermicompost (80:20 v/v). The yield, commercial quality and phytochemical of the fruit were evaluated. The results showed that yield was higher with Steiner solution (6.752 kg m⁻²), and *Bryothamnion triquetrum* (T2) algae yielded was 6.07 kg m⁻². With respect to phenolic content, the extracts exceeded the control treatment, which were statistically equal to *Macrocystis pyrifera* and *Macrocystis pyrifera* P. with values of 47.37 and 43.73 mg equiv. of Ac. Gallic 100 g fresh weight, respectively. For antioxidant capacity by ABTS⁺ and DPPH⁺ methods, the treatment with algae *Macrocystis pyrifera* was higher with 149.4 and 454.1 μM equiv Trolox / 100 g fresh base, respectively. In the same way, this treatment presented the highest value of vitamin C with 5.07 mg / 100 g fresh base being 27% greater than the control treatment. Algae extracts increased the quality of the fruits by obtaining greater antioxidant capacity and their use could be a viable option..

Keywords: *Cucumis sativus*, vermicompost, nutraceutical, ABTS⁺, DPPH⁺.

12.2 INTRODUCTION

The production of protected vegetables is among the main export activities in Mexico, as it occupies the fourth place worldwide and the first in the Americas (USDA, 2014). The main crops produced are tomatoes (70%), pepper (16%) and cucumber (10%) (SAGARPA, 2015). The production of these vegetables is mainly located in the northwest (72%) and center of the country (19%). About cucumber, this is of great demand in the United States of America (USA) and has had unprecedented growth in recent years. Its importation grew from 394 107 tons in 2002 to 459 242 in 2012 (FAOSTAT, 2015). Of this import volume, 80% comes from Mexico which is the main exporting country to the USA (FIRA, 2017). Under conditions of protected agriculture, the production of Cucumber is 2 to 9 times more than in open field depending on the technological level, the management and the climatological conditions constituting an alternative in this type of systems (FUMIAF, 2005).

The nutrition of this crop is an important factor in maximizing its production. In several regions, they make an indiscriminate use of agrochemicals and the excessive cultural practices have brought serious consequences to the environment reaching the environmental limit. In addition, the high costs that fertilizers have acquired make them stay out of the reach of producers, with low yields and low incomes (Luévano and Velázquez, 2001) and poor quality food facts. In addition to the foregoing, in the large market importers of vegetables there is a tendency of the consumer towards the acceptance of "innovative, different" products, suitable products and that contribute to an ever-healthier food and with less environmental impact on natural Resources (UNEP-IRP, 2016). The implementation of biological control and organic nutrition with biofertilizers could reduce

dependence on agrochemicals and thus make production less hazardous to the environment and the consumer. Additionally, the application of these products can reduce the use of chemical fertilizers, increase performance and stress resistance by water and temperature tensions and positively influence their growth and physiology.

Today there are alternatives by seaweed extracts (EAM), as they not only contain nitrogen, phosphorus and potassium, but these products present molecules with a very wide range of structures and can be composed by phytohormones or metabolically active plant extracts such as amino acids and organic acids (Ahmed and Shalaby, 2012). Eman *et al.* (2008) and Sathya *et al.* (2013) mention that seaweed extracts contain a wide variety of plant growth-promoting substances such as auxins, cytokinins, betaines, gibberellins, and organic substances such as amino acids, macronutrients, and trace elements that improve crop yield and quality.

The EAM are natural bioactive materials soluble in water, are organic fertilizers that promote germination of seeds and that increase the development and yield of crops (Norrie and Keathley, 2006). They have been used as nutritional supplements, biostimulants or biofertilizers in agriculture and horticulture (Hernández-Herrera *et al.*, 2014). In recent years, the use of marine algae extracts as biofertilizers has allowed the partial substitution of conventional mineral fertilizers (Zodape *et al.*, 2011). These can be used as liquid extracts applied in foliar form, to soil, or in granular form as soil improvers and fertilizer (Thirumaran *et al.*, 2009). The EAM have been used to increase germination, fruit weight and yield in tomato (Sutharsan *et al.*, 2014); in cucumber plants to improve chlorophyll, carbohydrates, fruit diameter, yield and vitamin C (Taha *et al.*, 2012; Ahmed and Shalaby,

2012); in beans to increase leaf area, number of leaves, fresh stems and biomass (Yehia *et al.*, 2016). In Stevia plants (*Stevia rebaudiana* Bertoni), marine algae extracts have improved some morphological, anatomical and chemical characteristics (Salama *et al.*, 2014). Due to the above, and due to the importance of the growing protected horticulture in the Comarca Lagunera, the objective of this research is to improve the yield and phytochemical quality of cucumber.

12.3 MATERIALS AND METHODS

The work was carried out in shade mesh in the autumn - winter agricultural cycle, at the Technological Institute of Torreon (ITT), located at km 7.5 of the old Torreon - San Pedro road, Municipality of Torreon, Coahuila. The mesh is an Agro Shade model of 250 m² with maximum wind resistance of 120 km / h, load capacity greater than 35 m². The mesh is 16X10 strands of stabilized monofilament of flat fabric at 50% shade. The structure is manufactured with materials in accordance with the Mexican standard for the design and construction of greenhouses (NMX-E-255-CNCP-2008).

The treatments evaluated were five biofertilizers based on seaweed extracts: T1 = *Macrocystis pyrifera*, T2 = *Bryothamnion triquetrum*, T3 = *Ascophyllum nodosum*, T4 = *Grammatophora sp.*, T5 = *Macrocystis pyrifera P.* They were compared with a control treatment (T6) with Steiner Solution (SS).

The chemical characteristics of the algae are presented in **Table 1**. The experimental design was completely randomized with six treatments and six repetitions resulting in 36 experimental units. An analysis of variance (ANOVA) and the Tukey separation test ($P \leq 0.05$) were performed, using the statistical program SAS ver. 6.03 (SAS, 1993).

Form of application of the extracts: Foliar applications were made according to the technical recommendation (Canales, 1999) for horticultural crops at a rate of 2 L ha⁻¹ or 200 cc / 100 L of water. The applications were started

eight days after the transplant and, subsequently, every 15 days until the culture was 80 days after the transplant (dds).

Table 1 • Chemical composition of seaweed extracts evaluated in cucumber production

Compound	<i>Macrocystis pyrifera</i>	<i>Bryothamnion triquetrum</i>	<i>Ascophyllum nodosum</i>	<i>Grammatophor sp.</i>	<i>Macrocystis pyrifera P.</i>
	----- % P/V -----				
Organic material	3.49000	4.15000	n.a	3.50000	2.94400
Nitrogen	0.14700	1.45000	3.00000	1.14500	0.02630
Phosphorus	0.00800	1.36000	0.10000	0.02000	0.00540
Potassium	0.07700	1.48000	5.30000	2.00000	1.31000
Magnesium	0.01360	n.a	0.15000	0.02000	0.00236
Bore	0.00061	n.a	0.0003	n.a	0.00093
Zinc	0.00013	0.00075	n.a	0.00025	0.00126
Silicium	n.a*	0.00027	n.a	n.a	n.a

Source: Technical specifications of the product. *n.a = not available.

The substrate used was an organic one using the proportions 80% sand + 20% vermicompost, substrate that has been evaluated in several investigations showing the best results for this vegetable (Díaz-Méndez *et al.*, 2014). The chemical and physical characteristics of the substrate are presented in **Table 2**.

For the control treatment, a hydroponic substrate formulated with disinfected and sterilized river sand was used (González *et al.*, 2016), and perlite in a ratio of 80:20 (v/v). The treatments based on algae and the control were established in black polyethylene containers, caliber 600 of 18 kg capacity.

12.3.1 Agronomic management of the crop

The cucumber seed was the Hisham 1110 variety, which was planted in 200 cavity polyethylene trays using the Premier Promix P6X pedestrian substrate, using one seed per cavity. The transplant to the pots was carried out when the seedlings reached a height between 5 and 7 cm and presented three to five true leaves.

Irrigation was carried out in the morning, providing an average of 0.750 L of water per pot per day; this condition varied depending on the evaporation and environmental conditions within the shade mesh. The control treatment (SS) was irrigated with nutrient solution (Steiner, 1984) every day applying an average of 0.750 L per pot. The solution was diluted at 30, 50, 75 and 100% concentration according to the

Table 2. • Chemical and physical composition of the organic substrate of vermicompost: sand used in the evaluation of algae extracts in the shade-grown cucumber culture

Nutrient	Sand + Vermicompost (80:20)		
	mg kg ⁻¹		
Nitrate	13.72	Texture (sand-silt-clay)	97-1-2
Phosphorus	15.33	CEC (meq/100g)	9.00
Carbonates	3.30	pH	7.91
Potassium	198.5	OM (%)	7.04
Iron	1.76	CE (dS m ⁻¹)	3.21
Copper	0.49	R	2.95
Zinc	0.53	ESP	2.99
Manganese	2.91		

Source: Analyzes carried out in the Laboratory of ITT and the Coop. Agrop. of Comarca Lagunera.

CEC= Cation exchange capacity, pH= Hydrogen potential, OM = Organic material, R=Rate; ESP= Exchangeable sodium percentage.

phenological stage of the culture. Organic products were used in the control of pests and diseases, which included organic repellents. For the control of whitefly (*Bemisia tabaci*), Neem extract and garlic extract were applied, the dose of which was 40 mL in 20 L of water applied once in the morning at intervals of every 8 days.

Irrigation was carried out in the morning, providing an average of 0.750 L of water per pot per day; this condition varied depending on the evaporation and environmental conditions within the shade mesh. The control treatment (SS) was irrigated with nutrient solution (Steiner, 1984) every day applying an average of 0.750 L per pot. The solution was diluted at 30, 50, 75 and 100% concentration according to the phenological stage of the culture. Organic products were used in the control of pests and

diseases, which included organic repellents. For the control of whitefly (*Bemisia tabaci*), Neem extract and garlic extract were applied, the dose of which was 40 mL in 20 L of water applied once in the morning at intervals of every 8 days.

For the tutoring, polyethylene agricultural raffia was placed with the purpose of helping the plants to support themselves and bear the weight of their fruits. Pruning was carried out, which consisted of the elimination of side shoots or secondary stems, leaving only one (Gutiérrez *et al.*, 2014). The pollination was done manually by peeling off the petals of a male cucumber flower to expose the anthers and extract the pollen and using a cotton swab it was gently covered over the stigma of a flower to ensure the mooring of the fruits.

12.3.2 Evaluated variables

The length and diameter of the harvested fruits were measured with a digital vernier. The

firmness of the fruits was measured using an Extech penetrometer (FHT200) and the average of two measurements per fruit was reported in Newton (N). The total soluble solids (SST) were measured with a 0 - 32% manual refractometer (Sper scientific 300001) and the results were reported in °Brix. The yield was obtained from all the harvested fruits of each plant considering its commercial maturity. A digital analytical balance of the Shimadzu brand was used. The result was expressed in grams per plant (g plant^{-1}) and kilograms per square meter (kg m^{-2}) considering four plants in a three-bolillo arrangement.

12.3.3 Phytochemical quality

Mature cucumber samples were taken in each treatment, the harvested fruits were washed with drinking water for 2 minutes to remove residues and lyophilized for 5 days. Subsequently, the dry material was pulverized manually (using mortar and pestle), stored in plastic tubes at -18°C until obtaining extracts.

12.3.4 Obtaining extracts

Was take 250 mg of dry sample were mixed in 5 ml of HPLC-grade methanol in plastic tubes with screw cap, which were placed on a rotary shaker (ATR Inc., EU) for 24 hours at 20 rpm at room temperature (25°C). The tubes were centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes and the supernatant was removed for analysis.

12.3.5 Total phenolic content

The total phenolic content was measured using a modification of the Folin-Ciocalteu method (Esparza Rivera *et al.*, 2006). Said content was calculated by means of a standard curve using gallic acid (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) as standard, and the results were reported in mg of equivalent gallic acid per g of dry base sample ($\text{mg equiv AG} / \text{g BF}$). The analyzes were performed in triplicate.

12.3.6 Equivalent antioxidant capacity in Trolox (ABTS⁺ method)

The equivalent antioxidant capacity in Trolox was evaluated by the in vitro ABTS⁺ method published by Esparza-Rivera *et al.* (2006). The results were reported as equivalent antioxidant capacity in mM equivalent in Trolox per g dry base ($\text{mM equiv Trolox} / \text{g BF}$).

12.3.7 Equivalent antioxidant capacity in Trolox /DPPH⁺ method)

Antioxidant capacity was evaluated through the DPPH⁺ in vitro method using a modification of the method published by Brand-Williams (1995). The results were reported as equivalent antioxidant capacity in μM equivalent in Trolox per g fresh base ($\mu\text{M equiv Trolox} / 100 \text{ g BF}$).

12.3.8 Vitamin C content

The vitamin C content was determined using a modification of the chromatograph method cited by Esparza-Rivera *et al.* (2006). The obtained extract was filtered through a membrane filter of $0.45 \mu\text{m}$ before being injected in a high-resolution chromatography equipment Hewlett Packard (1200 Series, Palo Alto, Calif., USA) using the Chem Station software for CL (Agilent Technologies, Palo Alto, Calif., USA). The ascorbic acid (vitamin C) was eluted on a C18 Supelco column ($150 \text{ mm} \times 5.0 \times 0.5 \text{ cm}$) at a flow rate of $0.5 \text{ ml} / \text{min}$, using a 50:50 mixture of phosphoric acid as the mobile phase. 0.5% and methanol (chromatograph grade). The effluent was monitored at 254 nm in a diode array detector. The results were obtained using a standard curve for ascorbic acid (Sigma) and reported as mg of ascorbic acid per g fresh sample. The analyzes were performed in duplicate.

12.4 RESULTS AND DISCUSSION

The length and diameter of the fruit, as well as the firmness and concentration of soluble solids, were better in the

chemical treatment (SS), as seen in the **Table 3**. The best treatment of the algae extracts, for the case of the size of the fruit, was the *Bryothamnion triquetrum* algae, being statistically equal to the control treatment. Regarding diameter, the *Macrocystis pyrifera* P. algae was statistically equal to the control and, with respect to SST, the *Macrocystis pyrifera* algae showed the lowest value (see **Table 3**). In the case of firmness, there were no differences between treatments. These values are similar at those reported by López *et al.* (2011), who reported values between 4.5 and 5.

With respect the size of the fruit, López-Elías *et al.* (2011) and DeGannes *et al.* (2014) have indicated that the length of the American cucumber fluctuates between 20 and 25 cm, not being less than 15 cm (USDA, 1997). For the diameter of the fruit, López-Elías *et al.* (2015) found an average diameter of 5.1 cm in

American cucumber; as Wittwer and Honma (1997) who found that the diameter of the fruit in cucumber fluctuates from 5.0 to 5.7 cm, this should not exceed 6.0 cm (USDA, 1997). From the results obtained it can be observed that the foliar applications of the algae extracts evaluated presented similar values to those obtained in the control treatment. This result can be attributed to the benefits of algae when used in horticultural crops. In this regard, Bajpai (2016) points out that algae present active organic compounds as growth regulators. Metting *et al.* (1990) have indicated that the physiological responses derived from the application of marine algae include greater nutrient mobilization, the development of a vigorous root system, an increase in chlorophyll content, leaf area and delay in fruit senescence.

Table 3 • Diameter, length, total soluble solids and firmness of cucumber fruits in shaded house conditions, with foliar applications of algae extracts.

Treatment	Fruit quality			Total soluble solids	Firmness
	Length	Diameter	Weight	solids	
	----- cm	-----	g fruit ⁻¹	°Brix	N
T1(<i>Macrocystis pyrifera</i>)	13.36 d [†]	3.38 d	154.33 e	3.44 b	5.60
T2(<i>Bryothamnion triquetrum</i>)	16.43 a	4.52 c	264.66 b	4.81 a	5.23
T3(<i>Ascophyllum nodosum</i>)	14.73 c	4.64 b	223.66 c	4.59 a	5.30
T4(<i>Grammatophora sp.</i>)	15.93 ab	4.60 bc	210.33 d	4.88 a	5.56
T5(<i>Macrocystis pyrifera</i> P.)	15.33 bc	4.80 a	208.33 d	4.69 a	5.56
T6(Steiner Solution)	16.73 a	4.82 a	286.00 a	4.76 a	4.76

Values with equal letters within each column are statistically similar (Tukey, $P \leq 0.05$).

Regarding the content of soluble solids (SST), the treatments *Bryothamnion triquetrum* (T2), *Ascophyllum nodosum* (T3), *Grammatophora sp.* (T4) and *Macrocystis pyrifera* P. (T1) were statistically equal to the treatment with Steiner

solution (SS), with an average value of 4.76 °Brix, and being different from the treatment with *Macrocystis pyrifera* algae that decreased the SST by 29% (**Table 3**). In cucumber fruits values have been reported with a range of 3.7 to

4.2 ° Brix but it depends on several occasions on the genotype (Parra *et al.*, 2009). Colapietra and Alexander (2005) observed an increase of up to 17 ° Brix in a table grape crop (cv Italia) with foliar application of seaweed extracts *Ascophyllum nodosum*.

Similarly, Khan *et al.* (2012) report increases of 28% of total sugars in Perville cv Vine by applying *Ascophyllum nodosum*. On the other hand, Kumari *et al.* (2011) mention a higher concentration of total soluble sugars in the tomato crop with soil and foliar applications of seaweed extract *Sagarssum johntonii*.

12.4.1 Weight of the fruit (g fruit⁻¹)

Tea (2008) has mentioned that the weight of the fruit in American cucumber should fluctuate between 300 to 400 grams. For this study, the different extracts of algae caused significant differences in weight ($P \leq 0.05$), being the control treatment (SS) the one with the highest weight. Regarding treatments with algae extracts, the *Bryothamnion triquetrum* sample was the best where the weight was 7% lower than the control, but 41% higher than the treatment with the *Macrocystis pyrifera*, which obtained the lowest weight.

The weights obtained in this research are 30% lower than those reported by other researchers (Grijalva *et al.*, 2007, López-Elías *et al.*, 2011), although similar at those found by Grijalva *et al.* (2011). The differences in weight may be because they are other hybrids, different climate conditions and management. The specifications (PC-021, 2005) for the use of the official mark Mexico Calidad Suprema (MCS, 2005) establishes two classes of cucumber in relation to its attributes. The fruits obtained in this work fall into the classification B (diameter 5.1-6.5 cm and length 14-16.5 cm) and, therefore, could compete in the national and International market.

12.4.2 Yield (g plant⁻¹)

The statistical analysis for this variable shows significant differences ($P \leq 0.05$) in the yield (g plant⁻¹) indicating that the foliar application of the marine algae extracts influenced the yield (**Figure 1**). The control treatment with Steiner solution reported the highest yield, being 9% higher than the best yield obtained with the algae extracts. The treatment with the *Bryothamnion triquetrum* alga showed a 42% higher yield with respect to the lower yield obtained with the alga *Macrocystis pyrifera*. The highest yield obtained by *Bryothamnion triquetrum* may be due to its greater effect on nutrient absorption. In this regard, Youssef *et al.* (2010) have indicated that the higher production of biomass and yield in cucumber plants could be attributed to the fact that the plants inoculated with biofertilizers have a greater capacity to maintain a high rate of net photosynthesis and a better nutritional status (high concentration of P, K, Mg, Fe, Zn and Mn) compared to non-inoculated plants. Likewise, Metting *et al.* (1990) have mentioned that the physiological responses derived from the application of seaweed include greater mobilization of nutrients, the development of a vigorous root system, an increase in the chlorophyll content, leaf area and delay in the senescence of the fruit.

About the yield obtained per square meter (kg m⁻²), it was obtained that the control treatment (SS) presented the highest yield. The treatments with algae extracts showed values between 2.54 and 6.08 kg m⁻² (see **Figure 1**). Regarding the performance in protected systems in Mexico, by SIAP (2013) reports, the average yield of cucumber is 98 t·ha⁻¹ (9.8 kg m⁻²). For example, in the state of Baja California (Mexico) the average yield for this shade mesh culture is 17.6 kg m⁻² (Vázquez-Angulo *et al.*, 2013). In the case of the Comarca Lagunera (Mexico), with medium-tech production technology in shade mesh and fertigation, considering six plants the

yields fluctuate between 14 -17 kg m⁻² (SAGARPA, 2017).

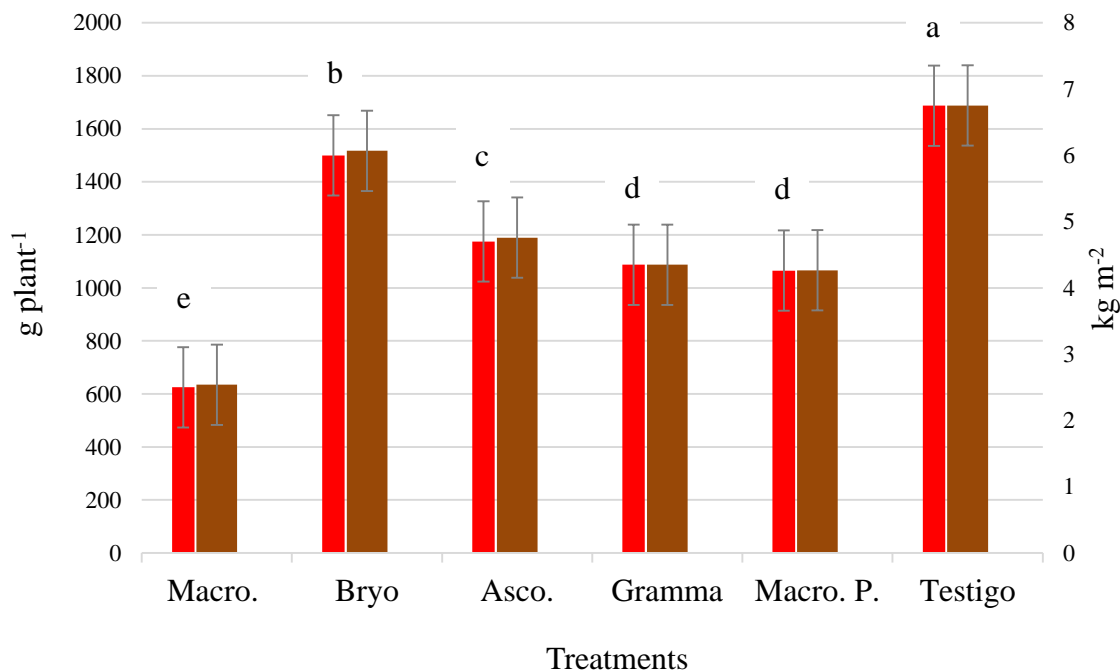


Figure 1 • Effect of foliar application of seaweed extracts on the performance of cucumber plants established in shade mesh. Means followed by the same letter are not significantly different (Tukey; $P \leq 0.05$).

Comparing the benefits of the yields obtained in this experiment with chemical fertilization and algae, it can be mentioned that the latter are greater because they are friendly to the environment. The trend in the future is to produce organic cucumbers since they have a high demand by consumers. The payment of overpricing of these products in the foreign market could be higher in relation to the price of conventional products and, consequently, it would improve the cost-benefit ratio of their production (Márquez-Quiroz *et al.*, 2014).

12.4.3 Phytochemical quality

The phytochemical quality of the fruits (antioxidants, phenols and vitamin C) was affected by the algae extracts ($P \leq 0.05$). Higher values were obtained with the *Macrocystis pyrifera* algae (Table 4). Regarding the antioxidant capacity, in both determination methods (ABTS⁺ and DPPH⁺), *Macrocystis*

pyrifera again showed the highest value followed by *Bryothamnion triquetrum*. Both were statistically different from each other and different from the control treatment; exceeding it by 30% and 4%, respectively. With the DPPH⁺ method, the treatment with chemical fertilization presented the lowest value. These results can be explained considering the nutrient deficiency that the substrate presents, particularly nitrogen for the plant. In this regard, Lorio (1986) and Herms and Mattson (1992) mentioned that plants produce higher amounts of sugars and secondary metabolites when they are subjected to a deficit of readily available nitrogen.

However, the results obtained contrast with those found by Santiago-López *et al.* (2016) since when using organic sources of fertilization in cucumber, values of 779.9 to 1391.1 μM equiv Trolox / 100 g BF-1 were obtained. On

the other hand, Díaz-Méndez *et al.* (2014) used different proportions of vermicompost and obtained values of antioxidant capacity between 749.9 to 1015.2. Some research has shown that high concentrations of NaCl in substrates increase the activity of antioxidant enzymes (D'Amico *et al.*, 2003; Sgherri *et al.*, 2007). This result has been attributed to the synthesis of phenols by plants as a defense mechanism to counteract the negative effects of oxidative

stress (Meloni *et al.*, 2008). Therefore, phenolic compounds are the main drivers of antioxidant activity (Faezah *et al.*, 2013). In **Table 4**, the phenolic content for the *Macrocystis pyrifera* algae had the highest value (47.37), which was expected since it generated the highest antioxidant capacity.

Table 4 • Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C of cucumber produced in surplus mesh under the application of different nutrient solutions derived from algae.

Treatments	CAOX* (Method ABTS ⁺)	CAOX** (Method DPPH ⁺)	CFT***	CVITC ****
<i>Macrocystis pyrifera</i>	149.4 a	454.1 a	47.37 a	5.07 a
<i>Bryothamnion triquetrum</i>	110.4 b	373.9 bc	36.36 b	3.52 cd
<i>Ascophyllum nodosum</i>	90.6 c	295.9 d	30.52 c	3.12 cd
<i>Grammatophora sp.</i>	77.0 d	278.4 d	27.33 c	2.98 d
<i>Macrocystis pyrifera P.</i>	120.4 b	403.5 b	43.73 a	4.23 b
Pattern (SS)	105.9 b	349.7 c	36.03 b	3.70 bc

* CAOX: Antioxidant capacity (ABTS⁺ method), results in μM equiv Trolox / 100 g fresh base.

** CAOX: Antioxidant capacity (DPPH⁺ method), results in μM equiv Trolox / 100 g fresh base.

*** CFT: Total Phenolic Content, results in mg equiv of gallic acid / 100 g fresh base.

**** CVITC: Vitamin C content, results in mg / 100 g fresh base. Differences between means obtained by Tukey test ($P \leq 0.05$). Values in columns with different lowercase letters are statistically different ($P \leq 0.05$).

The cucumber provides a large amount of vitamin C (mg / 100 g fresh base) and, in this experiment, the treatments with the highest content were the alga *Macrocystis pyrifera* (5.07), *Macrocystis pyrifera P.* (4.23) and the control treatment (3.70). The alga *Grammathosfera sp.* presented the lowest value being 40% lower with respect to *Macrocystis pyrifera*. Nagy and Pintér (2015) have pointed out that the positive effect of seaweed extract can be interpreted in the high content of high quality proteins, amino acids such as lysine and tryptophan, essential minerals, trace elements,

B-complex vitamins and bio-constituents, especially cytokinins.

12.5 CONCLUSIONS

With chemical fertilization, higher yields and commercial quality were obtained in cucumber fruits, mainly due to the higher concentration of N and the ionic balance of the nutritive solution. Of the treatments with algae extracts, *Bryothamnion triquetrum* (T2) was superior in total soluble solids, fruit firmness, fruit size and yield.

However, with the extract *Macrocystis pyrifera* (T1) the highest antioxidant capacity, phenols and vitamin C were obtained. The algae extracts provided some phyto-nutrients for the nutrition of the cucumber plants and increased the quality of the fruits by obtaining greater antioxidant capacity. Therefore, under the conditions of the experiment its use is a viable option to help minimize the application of conventional fertilizers, which would attenuate the effects on the environment and improve the health of the population.

12.6 REFERENCES

- Ahmed, Y. M. and Shalaby, E. A.** 2012. Effect of different seaweed extracts and compost on vegetative growth, yield and fruit quality of cucumber. *J. Hortic. Sci. Orna. Plants.* 4:235-240.
- Bajpai, Vivek K.** 2016. Antimicrobial bioactive compounds from marine algae: A mini review. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 45:1076-1085.
- Canales, L.B.** 1999. Enzimas-algas: posibilidades de su uso para estimular la producción agrícola y mejorar los suelos. *TERRA* 17:271-276.
- Colapietra, M., and A. Alexander.** 2005. Effect of foliar fertilization on yield and quality of table grapes. *Acta Hortic. V International symposium on mineral nutrition of fruit plants* 721:213-218.
- Crouch IJ, Smith MT, van Staden J, Lewis MJ, Hoad GV.** 1992. Identification of auxins in a commercial seaweed concentrate. *J Plant Physiol* 13:590–594.
- D’Amico, M.L., R. Izzo, F. Tognoni, A. Pardossi, F. Navari-Izzo.** 2003. Application of diluted sea water to soilless culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): Effects on plant growth, yield, fruit quality and antioxidant capacity. *JFAE* 1:112-116.
- DeGannes, A.; Heru, K.R.; Mohammed, A.; Paul, C.; Rowe, J.; Sealy, L.; Seepersad, G.** 2014. *Tropical Greenhouse Manual for the Caribbean.* CARDI, Trinidad and Tobago. 157 pp.
- Díaz-Méndez, H.A., Preciado-Rangel, P., Álvarez-Reyna, V.P., Fortis-Hernández, M., García-Hernández, J.L., y Sánchez-Chávez, E.** 2014. Producción orgánica y capacidad antioxidante de frutos de pepino. *ITEA* 110:335-342.
- Eman A. Abd El Moniem and A.S.E. Abd-Allah.** 2008. Effect of Green Alga Cells

- Extract as Foliar Spray on Vegetative Growth, Yield and Berries Quality of Superior Grapevines. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 4: 427-433.
- Esparza-Rivera, J.R., M.B. Stone, C. Stushnoff, E. Pilon-Smits, and P.A. Kendall.** 2006. Effects of ascorbic acid applied by two hydrocooling methods on physical and chemical properties of green leaf lettuce stored at 5 °C. *J. Food Sci.* 71:270-276.
- Escalona A., M. Santana, I. Acevedo, V. Rodríguez, y L.M. Marcó.** 2009. Efecto de las fuentes nitrogenadas sobre el contenido de nitratos y lecturas "spad" en el cultivo de lechuga. *Agronomía Tropical* 59:99-105.
- Faezah, O.N., Aishah, H.S., Kalsom, U.** 2013. Comparative evaluation of organic and inorganic fertilizers on total phenolic, total flavonoid, antioxidant activity and cyanogenic glycosides in cassava (*Manihot esculenta*). *African Journal of Biotechnology* 18: 2414-2421.
- Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA).** 2017. TLCAN Agropecuario: expectativas y tendencias recientes. <https://www.fira.gob.mx/InfEspDtoXML/abrirArchivo.jsp?abreArc=19440> (consultado: 15 marzo 2017).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical (FAOSTAT).** 2015. FAO Statistical Pocketbook Word Food and Agriculture. Disponible en <http://www.fao.org/faostat/es/#data>. (consultado: 17 febrero 2016).
- Fundación Mexicana para la Investigación Agropecuaria y Forestal (FUMIAF).** 2005. Cultivo de pepino Europeo en invernaderos de alta tecnología en México. Fundación Mexicana para la Investigación Agropecuaria y Forestal, A. C. SAGARPA. México. 37 pp.
- González B ML, M Fortis H, P Preciado R, MA Segura C, E Salazar Sosa, JL García H, JR Esparza R.** 2016. Calidad fitoquímica de tomate Saladette producido con sustratos orgánicos bajo condiciones de invernadero. *PHYTON* 85:71-78.
- Grijalva, C.R.L., Macías, D.R. y Robles, C.F.** 2007. Productividad de seis variedades de pepino europeo bajo condiciones de invernadero en el Noroeste de Sonora. *Biotecnia* 9:32-38.
- Grijalva, C.R.L., Macías, D.R., Grijalva, D.S.A. y Robles, C.F.** 2011. Evaluación del efecto de la fecha de siembra en la productividad y calidad de híbridos de pepino europeo bajo condiciones de invernadero en el noroeste de sonora. *Biotecnia XIII*: 29-36.
- Hala M. Taha Hanan A. Said, Wafaa M. Abdel-aziz Abd El-Fattah Khaleafa.** 2012. Effect of zinc and copper toxicity on growth and some metabolites of the green alga tetraselmis chuii butcher. *Egypt. J. Exp. Biol. (Bot.)*, 8:183-192.
- Hermes DA., Mattson WJ.** 1992. The dilemma of plants: to grow or to defend. *Quarterly Review of Biology* 67: 283-335.
- Hernández-Herrera, R. M., F. Santacruz-Ruvalcaba, M.A. Ruiz-López, J. Norrie, and G. Hernández-Carmona.** 2014. Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Appl. Phycol.* 26:619-628.
- Khan, S., B. Ahmad, M.J. Jaskani, R.Ahmad, and A.U. Malik.** 2012. Foliar application of mixture of amino acids and seaweed (*Ascopylum nodosum*) extract improve growth and physicochemical properties of grapes.

- International Journal of Agriculture and Biology 14: 383-388.
- Kumari, R., I. Kaur, and A. K. Bhatnagar.** 2011. Effect of aqueous extract of *Sargassum johnstonii* Setchell and Gardner on growth, yield and quality of *Lycopersicon esculentum* Mill. Journal of Applied Phycology 23:623-63.
- López, JE., Huez, L.M.A., Pacheco, A.F., Jiménez, J.L. y Preciado, F.F.A.** 2011. Productividad y calidad de dos cultivares de pepino en respuesta a la densidad de plantación. BIOtecnia XIII: 23-28.
- López-Elías, J., Rodríguez C, R., Huez, M.A.L., Garza O, S., Jiménez L.J., Leyva E.E.I.** 2011. Producción y calidad de pepino (*Cucumis sativus* L.) bajo condiciones de invernadero usando dos sistemas de poda. IDESIA 29:21-27.
- López-Elías, J., Garza Ortega, S., Huez López, M.A., Jiménez León, J., Rueda Puente, E.O.** 2015. Producción de pepino (*Cucumis sativus* L.) en función de la densidad de plantación en condiciones de invernadero. European Scientific Journal 11:25-36.
- Lorio PL Jr.** 1986. Growth-differentiation balance a basis for understanding southern pine beetle interactions. Forest Ecology and Management 14: 259-273.
- Madeira AC; Ferreira A; Varennes A; Vieira M.** 2003. SPAD meter versus tristimulus colorimeter to estimate chlorophyll content and leaf color in sweet pepper. Communications in Soil Science and Plant Analysis 34: 2461-2470.
- Mancuso, S., Azzarello, E., Mugnai, S., Briand, X.,** 2006. Marine bioactive substances (IPA extract) improve foliar ion uptake and water tolerance in potted *Vitis vinifera* plants. Advances in Horticultural Science, 20:156–161.
- Marca Oficial México Calidad Suprema en pepino (MCS).** 2005. PC-021-2005 Pliego de condiciones para el uso de la Marca Oficial México Calidad Suprema en pepino. Bancomex. http://www.mexicocalidadsuprema.org/assets/galeria/PC_021_2005_Pepino.pdf (Consultado: 21 junio 2017).
- Márquez-Quiroz, C., Cano-Ríos, P., Moreno-Reséndez, A., Figueroa-Viramontes, U., Sánchez-Chávez, E., De la Cruz-Lázaro, E., y Robledo-Torres, V.** 2014. Efecto de la fertilización orgánica sobre el rendimiento y contenido nutricional de tomate saladette en invernadero. ITEA 110:3-17.
- Meloni, D. A., Gulotta, M. R., Oliva, C. M. A.** 2008. El estrés salino incrementa la actividad de enzimas antioxidantes y la concentración de polifenoles en Vinal (*Prosopis ruscifolia* G.). Revista de Ciencias Forestales – Quebracho 15: 27-31.
- Metting, B.; Zimmerman, W. J; Crouch, I, and van Staden, J.** 1990. Agronomic uses of seaweed and microalgae. In: Introduction to applied phycology (Ed.). Akatsuka, I. SPB Academic publishing, The Hague. 589-627 pp.
- Mônica LA Pôrto; Mário Puiatti; Paulo CR Fontes; Paulo R Cecon; Jailson C Alves.** 2014. Índice SPAD para o diagnóstico do estado de nitrogênio na cultura do pepino japonês em ambiente protegido. Horticultura Brasileira 32: 292-296.
- Nagy, P.T. and Pintér.** 2015. Effects of Foliar Biofertilizer Spray on Nutrient Uptake, Yield, and Quality Parameters of Blaufrankish (*Vitis vinifera* L.) Grapes. Communications in Soil Science and Plant Analysis 46:219-227.

- Norrie J, and Keathley JP.** 2006. Benefits of *Ascophyllum nodosum* marine-plant extract applications to ‘Thompson seedless’ grape production. (Proceedings of the Xth International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production, 2005). *Acta Hort* 727:243–247.
- Olalde Gutiérrez, Víctor Manuel; Mastache Lagunas, Ángel Agustín; Carreño Román, Evaristo; Martínez Serna, José; Ramírez López, Margarito.** 2014. El sistema de tutorado y poda sobre el rendimiento de pepino en ambiente protegido. *Interciencia* 39:712-717.
- Parra Terraza, S. G. A. Baca Castillo, J. L. Tirado Torres, M. Villarreal Romero, P. Sánchez Peña y S. Hernández Verdugo.** 2009. Calidad del fruto, composición y distribución de elementos minerales en pepino en respuesta a silicio y al potencial osmótico de la solución nutritiva. *Terra Latinoamericana*, 27: 123-131.
- Peil, Roberta M.; Gálvez, José L.** 2005. Reparto de materia seca como factor determinante de la producción de las hortalizas de fruto cultivadas en invernadero. *R. Bras. Agrociência*, 11:05-11.
- Sathya A, R.N. Kanaga A, P. Sankar B , S. Jeeva C.** 2013. Antioxidant properties of phlorotannins from brown seaweed *Cystoseira trinodis* (Forsska^l) C. Agardh. *Arabian Journal of Chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.09.039>.
- Salama, E. S., Kabra, A. N., Ji, M. K., Kim, J. R., Min, B., and Jeon, B. H.** 2014. Enhancement of microalgae growth and fatty acid content under the influence of phytohormones. *Bioresource Technology*. 172:97-103.
- Santiago-López, G., Preciado-Rangel, P., Sánchez-Chávez, E., Esparza-Rivera³, J.R., Fortis-Hernández, M., Alejandro Moreno-Reséndez, A.** 2016. Organic nutrient solutions in production and antioxidant capacity of cucumber fruits. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 28:518-521.
- Secretaría de Ganadería Agricultura Pesca y Alimentación (SAGARPA).** 2015. Programa de Ejecución Directa de Agricultura Protegida. Secretaría de Agricultura Ganadería, Pesca y Alimentación. <http://2006-2012.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Agricultura-Protegida2012.aspx> (Consultado: 18 diciembre 2016).
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).** 2017. Estadísticas Agropecuarias de la Región Lagunera. <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/regionlagunera/Paginas/default.aspx> (Consultado: 21 de marzo 2017).
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).** 2013. Producción Agropecuaria y Pesquera, Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta (SIACON). <http://www.siap.gob.mx/produccion-agropecuaria/> (Consultado: 07 de agosto 2016).
- S. Sutharsan, S. Nishanthi and S. Srikrishna.** 2014. Effects of Foliar Application of Seaweed (*Sargassum crassifolium*) Liquid Extract on the Performance of *Lycopersicon esculentum* Mill. In: Sandy Regosol of Batticaloa District Sri Lanka. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 14:1386-1396.
- Sgherri, T., F. Navari-Izzo, A. Pardossi, G.P. Soressi, R. Izzo.** 2007. The Influence of

- Diluted Seawater and Ripening Stage on the Content of Antioxidants in Fruits of Different Tomato Genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 55:2452-2458.
- Statistical Analysis System (SAS).** 1993. Institute inc. SAS user's guide. Statistics, versión 6.03 Edition. SAS Institute Inc., Cary, N.
- Steiner A. A.** 1984. The universal nutrient solution. In: Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture. International Society for Soilless Culture (ed), Lunteren, Netherlands 633-649 pp.
- Thirumaran, G.; Arumugam M.; Arumugam, R. and Anantharaman, P.** 2009. Effect of seaweed liquid fertilizer on growth and pigment concentration of *Cyamopsis tetragonoloba* (L) Taub. *Am. Eur. J. Agron.* 2:50-56.
- United States Department of Agriculture (USDA).** 1997. United States Standards for grades of cucumbers. United States Department of Agriculture. Agricultural Marketing Service. Fruit and Vegetable Division. Fresh Products Branch. 7 pp.
- United States Department of Agriculture (USDA).** 2014. National Agricultural Statistics Service. https://www.nass.usda.gov/Publications/Ag_Statistics/2014/ (consultado agosto 2017).
- United Nations Environment Programme – International Resource Panel (UNEP-IRP).** 2016. Food systems and natural resources. Printed: UNESCO. <http://www.unep.org/resourcepanel> (consultado 15 agosto 2017).
- Vázquez-Angulo, J.C., Grimaldo-Juárez, O., González-Mendoza, D.** 2013. Producción de *Cucumis sativus* en el valle de Mexicali, Baja California, México. *IDESIA* 31:17-20.
- Velázquez Gálvez, Noel Enrique; Luévano González, Armando.** 2001. Ejemplo singular en los agronegocios estiércol vacuno: de problema ambiental a excelente recurso. *Revista Mexicana de Agronegocios* 9:306-318.
- Vernieri P, Borghesi E, Ferrante A, Magnani G.** 2005. Application of biostimulants in floating system for improving rocket quality. *J. Food Agric. Environ.* 3:86-88.
- Varvel, G. E., W. W. Wilhelm, J. F. Shanahan, and J. S. Schepers.** 2007. An algorithm for corn nitrogen recommendations using a chlorophyll meter based sufficiency index. *Agron. J.* 99: 701-706.
- Wittwer, S.H. Honma, S.** 1997. Greenhouse tomatoes, lettuce, and cucumbers. Section 3, Greenhouse cucumbers. Michigan State University, USA. <http://www.lpl.arizona.edu/~bcohen/cucumbers>. 1997. (Consultado: 20 de marzo 2017).
- Yehia I. Abu Seif, Salah El-Din M. El-Miniawy, Nashwa A.I. Abu El-Azm, Amal Z. Hegazi.** 2016. Response of snap bean growth and seed yield to seed size, plant density and foliar application with algae extract. *Annals of Agricultural Science* 61:187-199.
- Youssef, R., M. Cardarelli, E. Mattia, M. Tullio, E. Rea, and G. Colla.** 2010. Enhancement of alkalinity tolerance in two cucumber genotypes inoculated with an arbuscular mycorrhizal biofertilizer containing *Glomus intraradices*. *Biol. Fert. Soils* 46:499-509.
- Zodape, S.T., A. Gupta, S.C. Bhandari, U.S. Rawat, D.R. Chaudhary, E.Eswaranand, and J. Chikara.** 2011. Foliar application of seaweed sap as biostimulant for enhancement of yield

and quality of tomato (*Lycopersicon
esculentum* Mill.). J. Sci. Ind. Res.
70:215-219.

Los micronutrientes en el cultivo *in vitro*

13

Pérez Álvarez, Sandra; Leyva Hernández, Héctor Alejandro; Flores Zamora, Gabriela Lizbeth; Antuna González, Cecilia; Angulo Atondo, Lluvia Stephany; González López, Marcela.

13.1	Resumen	215
13.2	Introducción	215
13.3	El cultivo <i>in vitro</i> vegetal	215
13.4	Los microelementos o micronutrientes en el cultivo <i>in vitro</i> en plantas	220
13.5	El cultivo <i>in vitro</i> de microorganismos de interés agrícola	223
13.6	Microelementos en el cultivo <i>in vitro</i> de microorganismos	227
13.7	Bibliografía	230

13

Los micronutrientes en el cultivo *in vitro*

Pérez Álvarez, Sandra; Leyva Hernández, Héctor Alejandro; Flores Zamora, Gabriela Lizbeth;
Antuna González, Cecilia; Angulo Atondo, Lluvia Stephany; González López, Marcela.

13.1 RESUMEN

El cultivo *in vitro* es una técnica que permite micropropagar plantas libres de patógenos y con elevados rendimientos, así mismo con los microorganismos podemos realizar estudios primarios para luego poder aplicarlos a invernaderos y por último directamente en el campo. En este capítulo se abordarán temáticas generales concernientes al cultivo *in vitro* de plantas (proyecto SIP20181215), así como los tópicos específicos del papel o función de los micronutrientes o microelementos en esta técnica tanto en plantas como en microorganismos, estos últimos específicamente hongos y nemátodos.

Palabras clave: Medios de cultivo, microelementos, micropropagación, nutrición.

13.2 INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* es una técnica mediante la cual partiendo de una planta madre se pueden utilizar cualquier parte de esta (hojas, tallos, yemas, raíces) para obtener una planta completa en un medio de cultivo apropiado y en condiciones de total asepsia (Asmita et al., 2017). Esto es posible por la Totipotencia celular que se define como la habilidad de una célula meristemática (no diferenciada) para expresar el genoma completo mediante la división celular (Haberlandt, 1902). Conjuntamente con la totipotencia celular, la capacidad de las células de adaptarse a un nuevo medio alterando su metabolismo, crecer y desarrollarse es importante para regenerar una nueva planta (Thorpe, 2007).

La agricultura moderna necesita tecnologías que garanticen la alimentación de una población mundial en aumento lo cual no solo se resolverá con buenas prácticas culturales, fertilización adecuada, medidas para el control de plagas sino también con la utilización de materiales de

propagación de calidad lo cual es proporcionado mediante el cultivo de tejidos vegetales (Suman, 2017).

En cuanto a los microorganismos son parte crucial de nuestro ecosistema manteniendo el planeta habitable, además de que tienen un gran potencial en la biotecnología, fundamentalmente en la agrícola teniendo ejemplos como la eliminación de químicos dañinos (exceso de nitrógeno proveniente de fertilizantes) de medios acuáticos, así como biorremediación y tratamiento de desechos (Green et al. 2010; Lal et al., 2010; Kostka et al., 2011) y el control de plagas donde hay microorganismos que controlan patógenos específicos sin dañar el medio ambiente ni la salud encontrándose entre ellos los biofungicidas (*Trichoderma*, *Beauveria*, *Metharrizium*), bioherbicidas (*Phytophthora*) y bioinsecticidas (*Bacillus*) (Gupta y Dikshit, 2010). Es importante el desarrollo de cultivos para continuar estudiando el potencial metabólico de los microorganismos en el laboratorio y sus funciones, así como el aislamiento, caracterización y preservación de estos, incluso la identificación de muchos que de no poder cultivarse seguiremos sin conocer su existencia (Prakash et al., 2013).

Por todo lo anteriormente expuesto en este capítulo se discutirán aspectos generales y relevantes del cultivo *in vitro* de plantas y de microorganismos, así como la función e importancia de los microelementos en esta tecnología.

13.3 EL CULTIVO *IN VITRO* VEGETAL

El cultivo de tejidos vegetales se basa en el cultivo de células, tejidos, órganos o de la planta completa bajo condiciones asépticas proporcionando los nutrientes, humedad, temperatura y fotoperiodo adecuado obteniéndose clones, es decir, material vegetal con características idénticas a la planta madre

(Thorpe, 2007). Las condiciones controladas de humedad y temperatura, conjuntamente con los medios de cultivo (nutrientes, hormonas, fuente de carbono, vitaminas) permiten el buen crecimiento y desarrollo del material vegetal. Esta tecnología se emplea fundamentalmente para la multiplicación de plantas a gran escala pudiendo obtenerse del material inicial cientos a miles de plantas, y actualmente se emplea para obtener material libre de patógenos (es una de las bases de la tecnología), obtener metabolitos secundarios de importancia médica y farmacéutica, mejoramiento de plantas, conservación de germoplasma, distribución rápida de recursos genéticos internacionalmente (Ahmadi et al., 2010; Akin-Idowu et al., 2009; Harding, 2004; Singh, 1992).

13.3.1 Fases del cultivo *in vitro* de plantas

El cultivo *in vitro* vegetal tiene cinco fases que se resumen en la **Figura 1**.

Fase 0: Es la fase en la cual se selecciona la planta madre o donadora del tejido que se utilizará (raíz, yema, hoja, semilla) y debe ser una planta sana con buenos rendimientos pues se obtendrán clones (Murashige, 1974; Cassells y Doyle, 2005).

Fase 1: Es la fase donde se establece el material vegetal seleccionado en un medio de cultivo adecuado (**Figura 2**).

Fase II: Es la fase de multiplicación (**Figura 4**). En esta fase es donde se obtendrá la cantidad de material vegetal necesario mediante diversos subcultivos que normalmente se realizan cada 21 días (Saini y Jaiwal, 2002).

Fase III: En esta fase de enraizamiento es donde todo el material obtenido se coloca en un medio adecuado para la producción de raíces adventicias. Generalmente en esta fase las sales de los medios de cultivo se reducen a la mitad (Olmos et al., 2010).

Fase IV: La fase de aclimatación es la fase en la cual las plantas obtenidas se adaptan a las condiciones *ex vitro*, para lo cual es necesario contar con invernaderos, utilizar sustratos debidamente desinfectados como perlita, vermiculita, arena, y la adaptación de las plantas a la luz y la humedad debe ser gradual (Olmos et al., 2010).

Es importante destacar que de la fase I a la III los explantes se colocan en cuartos estériles con temperatura entre 25 y 28°C, pH entre 5.2 y 6.5 y la luz de 0 a 12,000 lux (Calva y Ríos 1999, Seabrook, 1980), aunque algunos explantes requieren total oscuridad en la primera fase.

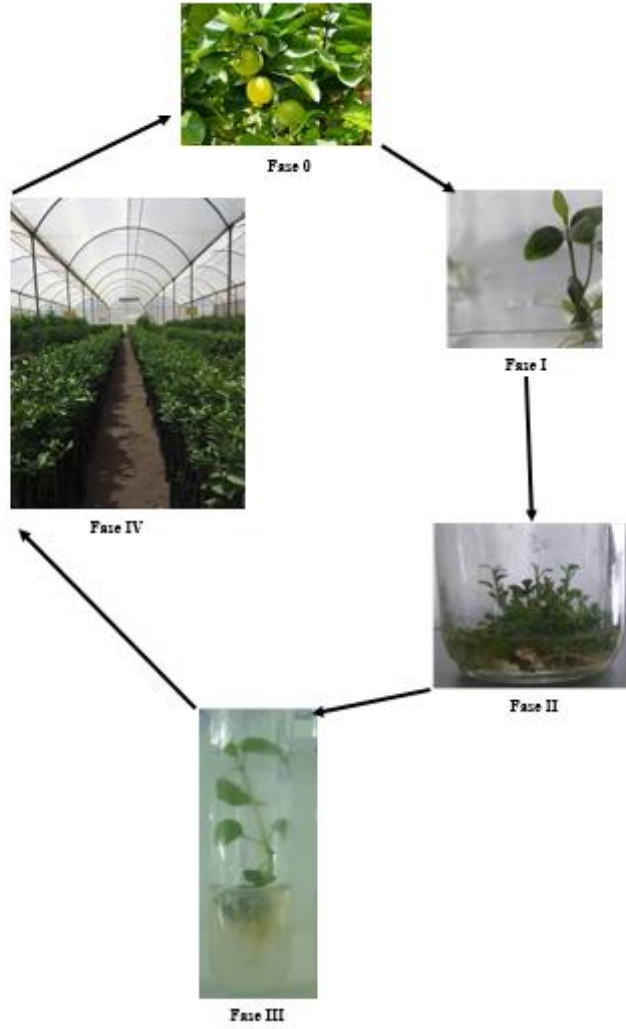


Figura 1 • Fases del cultivo *in vitro* donde 0: Selección de la planta madre, Fase I: Establecimiento, Fase II: Multiplicación, Fase III: Enraizamiento, Fase IV: Aclimatación

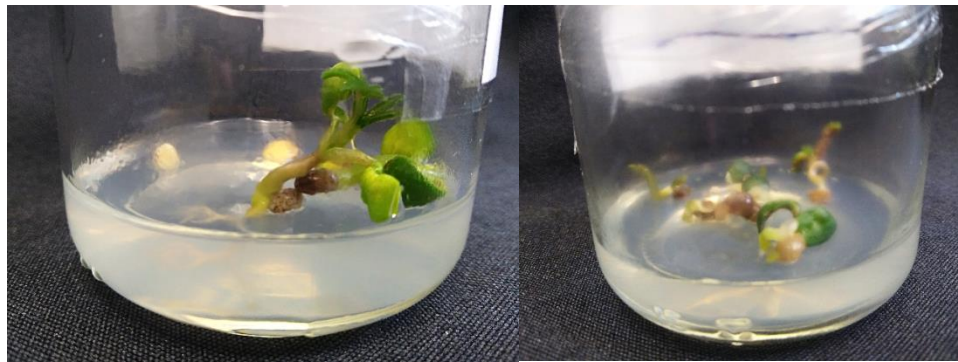


Figura 2 • Establecimiento de semilla de *Lupinus montanus* en medio agar-agua en el laboratorio de Cultivo *in vitro* del CIIDIR, Sinaloa del IPN, México

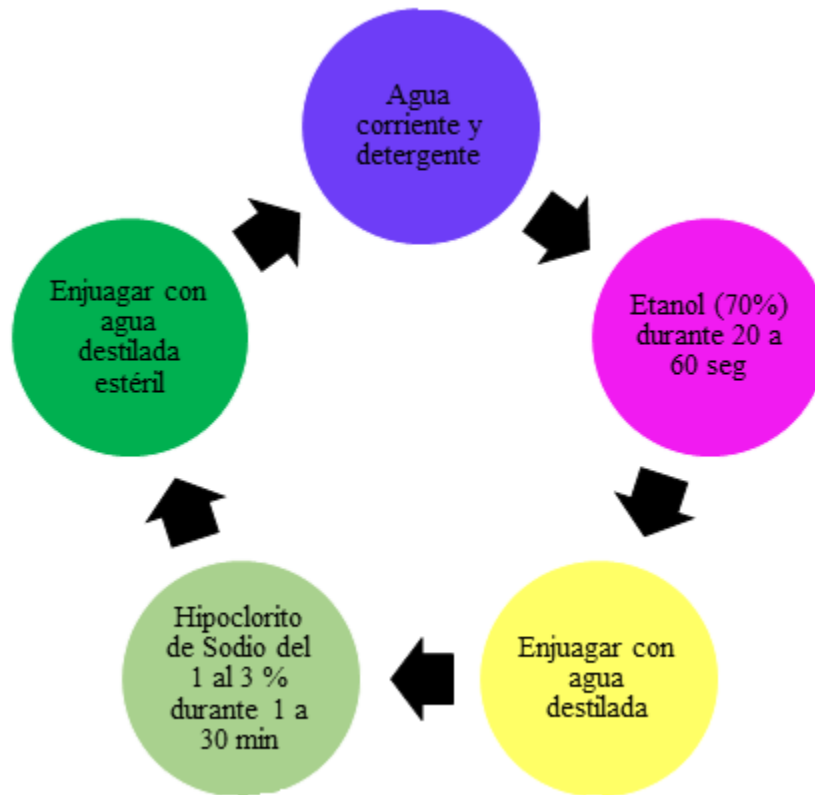


Figura 3 • Desinfección más común empleada en el cultivo *in vitro* vegetal.

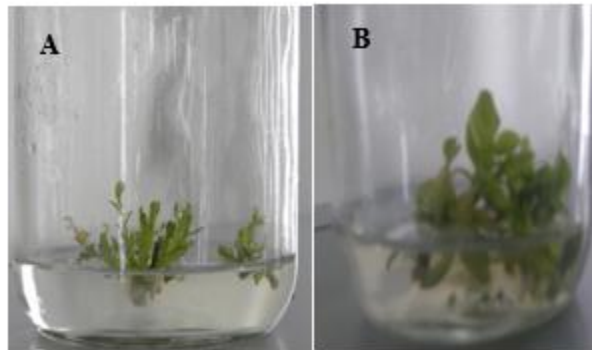


Figura 4 • Multiplicación de: A-Limón persa (*Citrus latifolia*), B-Limón mexicano (*Citrus aurantiifolia*) en el laboratorio de Cultivo *in vitro* del CIIDIR, Sinaloa del IPN, México.

13.3.2 Asepsia

La asepsia es sumamente importante en cultivo de tejidos vegetales y muchas veces es difícil de establecer materiales sin contaminar pues el material inicial tiene todo tipo de microorganismos y una vez establecidos las

condiciones de cultivo son propicias para la proliferación de hongos, bacterias y levaduras que en algunos casos no dañan al explante pero compiten por los nutrientes, y una vez

contaminado el medio se debe eliminar (Mroginski et al., 2010).

Un método muy utilizado para micropropagar material limpio es el cultivo de meristemos, que son un grupo de células indiferenciadas que tienen la capacidad de dividirse durante todo el ciclo de vida de la planta lo que hace un material libre de virus (García-González et al., 2010). La termoterapia y la quimioterapia son métodos que también se emplean para la eliminación de virus principalmente (Panattoni et al., 2013).

La termoterapia consiste en mantener partes de la planta a temperaturas elevadas (35 a 54°C) teniendo en cuenta el límite fisiológico de tolerancia de cada planta (Spiegel et al., 1993) y en la quimioterapia se utilizan diversos agentes químicos que provocan una disminución en la concentración del virus, un ejemplo de estos compuestos es la Ribavirina (Virazole es el nombre comercial) pero se plantea que es algo fitotóxica dependiendo de la dosis y de la especie (Conci, 2010).

Los medios de cultivo e instrumentos (pinzas, bisturís, placas Petri) deben estar debidamente estériles generalmente mediante autoclave con una presión de 1.46 kg cm² por 20 a 30 min, con esto es suficiente para eliminar los microorganismos. El trabajo con el material vegetal se realiza en campana de flujo laminar y luego se colocan en cuartos estériles (Mroginski et al., 2010).

13.3.3 Medios de cultivo

Los medios de cultivo son una mezcla de sales orgánicas e inorgánicas que en general son una fuente de carbono (sacarosa), macro y microelementos, reguladores del crecimiento para las diferentes fases (auxinas, giberelinas y citoquininas), vitaminas, agentes solidificante en caso de que el medio sea sólido o semi-sólido (Mroginski et al., 2010). Uno de los medios más

utilizados para el cultivo de tejidos vegetales es el Murashige y Skoog (MS, 1962) debido a su poca especificidad lo cual lo hace adaptable a casi cualquier especie vegetal, sin embargo, existen otros medios de cultivos que varían las concentraciones de macro y micronutrientes en dependencia del explante, si se requiere desarrollar metabolitos secundarios, etc, y algunos de estos medios son el medio Gamborg (B5), Kudson modificado, Mitra, entre otros (Gómez-Torres et al., 2014; Tazeb, 2017).

En la **Cuadro 1** se presentan algunos de los medios más utilizados en el cultivo de tejidos vegetales según Mroginski et al. (2010).

Los medios que se presentan son el MS (1962), N6 (Medio de Chu, 1975) y el B5 (Gamborg et al., 1968).

Cuadro 1 • Medios muy utilizados en el cultivo de tejidos vegetales

Compuestos	Medio básico ¹		
	MS	N6	B5
NH ₄ NO ₃	1.650	----	----
KNO ₃	1.900	2.830	2.500
KH ₂ PO ₄	170	400	----
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	166	150
(NH ₄) ₂ SO ₄	----	463	134
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185	250
NaH ₂ PO ₄ .4H ₂ O	----	----	150
KI	0,83	0,80	0,75
MnSO ₄ .H ₂ O	----	----	10,00
H ₃ BO ₃	6,20	1,60	3,00
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30	4,40	----
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	1,50	2,00
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	----	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	----	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80	27,85	27,80
Na ₂ EDTA	37,30	37,25	37,30
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	----	0,025
Glicina	2,00	2,00	----
Tiamina -HCl	0,10	1,00	10,00
Piridoxina -HCl	0,50	0,50	1,00
Ácido 1,00	Nicotínico	0,50	0,50
Mioinositol	100,00	----	100,00
Sacarosa	30.000,00	50.000,00	20.000,00
PH	5,7	5,8	5,5

¹⁾ Composición en mg L⁻¹.

13.4 LOS MICROELEMENTOS O MICRONUTRIENTES EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS

Las diferentes plantas, llámese especies o variedades, tienen diferentes requerimientos de los nutrientes que se encuentran en el medio de cultivo para su normal crecimiento y desarrollo por lo que es importante establecer las concentraciones

adecuadas y teniendo en cuenta esto se han realizado diferentes estudios.

Yasin et al. (2017) estudiaron el efecto de diferentes micronutrientes en el desarrollo de la orquídea *Spathoglottis plicata*. Los micronutrientes estudiados fueron el cobre (CuSO₄), zinc (ZnSO₄), Manganeseo (MnSO₄) y hierro (Fe-EDTA) en concentraciones de 0, 25, 50, 75 y 100 μM y se utilizó el medio MS (1962) a la mitad con plántulas de un mes de edad. Como resultados obtuvieron que con 25

μM de MnSO_4 los explantes tenían el mayor contenido de proteína soluble (38.98 mg g^{-1} peso fresco), el mayor contenido de clorofila con $75 \mu\text{M}$ de Fe-EDTA (22.32 mg g^{-1} peso fresco) y con $25 \mu\text{M}$ de Fe-EDTA se incrementó la producción de carbohidratos hasta 19.78 mg g^{-1} de peso fresco. Igualmente demostraron que las diferentes concentraciones de micronutrientes empeladas tenían diversos efectos en la concentración de enzimas como peroxidadas, catalasas, polifenol oxidasa y nitrato reductasa (Yasissn et al., 2017).

Rezali et al. (2017) estudiaron el efecto de la variación en las cantidades del medio MS (1962) (medio completo, $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$) y la consistencia de este (sólido y líquido) en la planta medicinal *Typhonium flageliforme* L. Los resultados mostraron que para el número de brotes por planta, altura de los botes, número de hojas el medio MS completo proporcionó los mejores resultados; el número de raíces, peso fresco y peso seco se obtuvieron resultados similares en el medio MS completo y $\frac{1}{2}$ MS; en cuanto al contenido de clorofila, a, b y clorofila total el mejor medio fue el $\frac{1}{4}$ MS, en todos los casos con el medio líquido. Al variar la cantidad de medio empleado se está cambiando la cantidad de micro y macroelementos en el medio de cultivo empleado.

Schwalbert et al. (2016) realizaron un estudio en una planta leguminosa forrajera *Desmodium incanum* DC analizando diferentes composiciones del medio MS (1962), de macro y microelementos. El estudio de los microelementos fue con MS 50%; MS 100% y microelementos al 50%; MS 50% y microelementos al 25%) obteniendo como resultados que la combinación MS 50% y microelementos al 25% proporcionó el mejor desarrollo de los explantes.

Bardar et al. (2015) analizaron el efecto de diferentes micronutrientes para acelerar la

formación de brotes *in vitro* en la planta medicinal *Eclipta alba* L. El medio MS (1962) de proliferación se suplementó con kinetina 0.5 a 5 mg L^{-1} y ácido giberélico (GA_3) de 0.1 a 3 mg L^{-1} y los microelementos cobalto (CoCl_2) en concentraciones de 0 ; 0.11 ; 0.55 ; 1.1 ; 2.2 ; 3.3 y $5.5 \mu\text{M}$; cobre (CuSO_4) en concentraciones de 0 ; 0.1 ; 0.5 ; 1 ; 2 ; 3 y $5 \mu\text{M}$; molibdeno (Na_2MoO_4) en concentraciones de 0 ; 1.03 ; 5.15 ; 10.3 ; 20.6 ; 30.9 y $51.1 \mu\text{M}$; Zinc (ZnSO_4) en concentraciones de hasta $10x$; manganeso (MnSO_4) en concentraciones de 0 ; 100 ; 200 ; 300 ; 400 ; 500 y $1000 \mu\text{M}$; Hierro (Fe-EDTA) en concentraciones de 0 ; 50 ; 100 ; 200 ; 300 ; 400 y $500 \mu\text{M}$; Iodo (KI) en concentraciones de 0 ; 2.5 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 y $25 \mu\text{M}$; y por último Boro (H_3BO_3) en concentraciones de 0 ; 50 ; 100 ; 200 ; 300 , 500 y $1000 \mu\text{M}$, cada microelemento se añadió por separado. Los resultados mostraron que el mayor número de brotes se obtuvo en el medio suplementado con GA_3 0.5 mg L^{-1} y cobre $1 \mu\text{M}$ (10 veces los niveles normales empleados en el medio MS).

Se realizó un estudio en el sorgo (*Sorghum bicolor* L.) para la inducción de raíces *in vitro* con la adición de cobre al medio de cultivo. Se utilizó el medio MS (1962) suplementado con diferentes auxinas; ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA) y ácido idolbutírico (IBA) y CuSO_4 en concentraciones de 0 (control), 1 , 2 y $5 \mu\text{M}$. Como resultados se obtuvo que en el medio MS (1962) suplementado con $1 \mu\text{M}$ de CuSO_4 y 1 mg L^{-1} de ANA, IBA y AIA se mejoró la proliferación de raíces y el desarrollo de los brotes (Liu et al., 2013).

En zanahoria (*Daucus carota* L.) se utilizaron elevadas concentraciones de cobre para determinar su efecto en el medio de regeneración de embriones androgénicos del cultivar 'Kazan F1' obtenidos del cultivo de anteras. El medio de cultivo empleado fue el B5 (Gamborg et al., 1968) suplementado con 0.1

μM de CuSO_4 como control y 1; 10 y 100 μM como tratamientos obtenido como resultados que las elevadas concentraciones en las primeras cuatro semanas influyeron positivamente en la formación de plantas completas y embriones secundarios, entre las nueve y quince semanas estas elevadas concentraciones causaron efectos negativos (deformaciones) (Kowalska et al., 2012).

Segmentos nodales de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni (planta perenne muy utilizada para la obtención de edulcorantes no nutritivos) se cultivaron en medio MS (1962) con un incremento de los microelementos Mn, Fe y B (100-600 μM), Co y Cu (0.1-5 μM) y KI (5-30 μM). Como resultado los autores obtuvieron una inducción de los botes con 400 μM de MnSO_4 , 10 μM de KI y 2 μM de CoCl_2 , así mismo las plántulas regeneradas con elevadas concentraciones de microelementos mostraron incrementos significativos en el contenido de clorofila en las hojas y en la biomasa (Jain et al., 2012).

Kalpana et al. (2009) estudiaron el número brotes de *S. rebaudiana* adicionando diferentes concentraciones de CuSO_4 (0.1; 0.5; 1; 2; 3 y 5 μM) al medio MS (1962) suplementado con 6 bencil aminopurina (6BAP) y ANA. Los autores obtuvieron que cuando la concentración del microelemento era de 0.5 μM (cinco veces la concentración del MS que es de 0.1 μM) el número de brotes por explante aumentó observándose más saludables y bien desarrollados.

Las semillas de tres especies de bromeliaceas (*Vriesea friburgensis* Mez, *Vriesea hieroglyphica* (Carrière) E. Morren, and *Vriesea unilateralis* Mez) se cultivaron *in vitro* en medio MS (1962) con los macronutrientes reducidos $\frac{1}{4}$, cuando se obtuvieron vitroplantas estas se subcultivaron en cuatro medios diferentes donde se variaron macro y

microelementos, de estos en el medio 1 el hierro (Fe) se utilizó a la mitad conjuntamente con el cobre (Cu) y el cloro (Cl), en el medio 2, 3 y 4, Fe; 3.730 mg L^{-1} ; Cu: 0.012 mg L^{-1} cambiando solamente el Cl: 53 mg L^{-1} ; 141 mg L^{-1} y 355 mg L^{-1} respectivamente, obteniéndose como resultado que en el medio 4 las tres especies estudiadas mostraron mayor peso fresco y seco (Aranda-Peres et al., 2009).

Un incremento en los niveles de cobre (CuSO_4) en el medio MS (1962) aumentó significativamente la regeneración de brotes partiendo de callos de trigo (*Triticum* spp.) y de discos de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), en el caso del trigo el cobre estimuló también la formación de raíces (Purnhauser y Gyulia, 1993).

Roustan et al. (1989) encontraron que el níquel (Ni) y el Co estimulan la morfogénesis en callos de zanahoria (*D. carota*) en el medio B5 (Gamborg et al., 1968). Concentraciones de 10 a 50 μM de CoCl_2 estimularon significativamente la formación de embriones somáticos, en cuanto al Ni (NiCl_2) incrementó menos el número de embriones en concentraciones de 20, 50 y 100 μM .

Un experimento realizado en 1977 por Lee y DeFossard donde omitieron algunos minerales (Fe, fosfatos, potasio, nitrato y Cl) durante la formación de brotes en el cultivo de segmentos nodales de fresa (*Fragaria ananassa* Duchesne) obtuvieron una reducción significativa en el desarrollo de los explantes y en el número de hojas.

No existen muchos estudios *in vitro* donde se varié la concentración de micronutrientes y como se ha plasmado en este acápite tienen un importante efecto en las diferentes fases y cultivos optimizando los medios de cultivos que tradicionalmente se emplean.

13.5 EL CULTIVO *IN VITRO* DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS AGRÍCOLA

A medida que la selección natural y la evolución han presionado a los organismos, algunos han desarrollado la capacidad de sobrevivir infectando, o de algún modo, limitando el ciclo de vida de otros. Estos mecanismos naturales han sido observados y han atrapado el interés del hombre debido a las aplicaciones biotecnológicas que esta capacidad natural de los organismos puede proporcionar al aprovechamiento de los recursos. Por ello, se han desarrollado medios de cultivo *in vitro* con el fin de reproducir microorganismos de interés agrícola, por su potencial bioinsecticida (McCoy y Glaser, 1936; Bedding, 1984), biofungicida y/o bioherbicida (Kremer, 2015).

Sin embargo, proporcionar una fuente de nutrientes y condiciones óptimas, no ha sido una tarea fácil. Un exceso de nutrientes puede ser perjudicial para el óptimo desarrollo de los organismos debido a la supresión de la actividad metabólica (Gil et al., 2002). De modo que, con el paso del tiempo se han ido mejorando estos medios y condiciones, para así, poder replicar y a la vez, sobrepasar la capacidad natural de reproducción de estos organismos benéficos para el interés del hombre (**Figura 5**).



Figura 5 • Cultivo *in vitro* de *Bacillus subtilis*

Algunos parámetros, ingredientes y protocolos de preparación de medios de cultivo de crecimiento *in vitro* de organismos, se han empleado para reproducción tanto a nivel laboratorio como a escalas industriales. Sin embargo, debido a que los organismos presentan diferencias en su naturaleza, metabolismo y modo de acción, la necesidad de cada organismo ha llevado a los investigadores a buscar y desarrollar medios y condiciones específicas para cada tipo de organismo.

13.5.1 Bioinsecticidas

Existen numerosos organismos, de una diversa ramificación taxonómica, que tienen la capacidad de causar patogenicidad en los insectos. Esta capacidad patogénica les proporciona potencial para ser utilizados como agentes insecticidas biológicos. Dentro de los organismos más populares se encuentran los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Rivero et al., 2018), los nemátodos entomopatógenos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae (Shapiro et al., 2012) y la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Sree y Varma, 2015). Para cada uno de estos organismos, se muestran medios y condiciones de crecimiento:

Cada hongo tiene requerimientos nutricionales diferentes (Latge, 1975).

Los hongos entomopatógenos requieren de agua, oxígeno, una fuente orgánica de carbono, nitrógeno orgánico e inorgánico, así como minerales y factores de crecimiento. Para el género *Beauveria* se han desarrollado medios específicos para su aislamiento, siendo uno de ellos el informado por Shimazu y Sato, (1996) compuesto por:

0.3% bactopectona

1.5% agar

0.2 mg ml⁻¹ CuCl₂

15 g de agar

2 mg ml⁻¹ violeta de genciana

1 L de agua destilada

Ajustar a pH 10

En el caso del género *Metarhizium*, se ha empleado el medio informado por Liu et al. (1993):

1% glucosa

1% peptona

1.5% oxgall

3.5% agar

10 mg ml⁻¹ dodina

250 mg ml⁻¹ cicloheximida

500 mg ml⁻¹ cloranfenicol

Además, para el cultivo de hongos entomopatógenos previamente aislados, se ha empleado el medio general de Lacey, (2012) compuesto por:

Agar Dextrosa Sabouraud y Extracto de Levadura (SDAY)

10 g neopeptona

40 g dextrosa

2 g de extracto de levadura

Por otro lado, y ya que los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de colonizar el tejido celular de los insectos, Grace (1962) (**Cuadro 2**) desarrolló un medio para el crecimiento de células de insectos, el cual posteriormente se empleó para crecer propágulos de *Entomophaga aulicae* (Tyrrell y MacLeod, 1972). Además, el medio Grace ha sido enriquecido agregando tejido de tórax de ortópteros y extracto abdominal, logrando un exitoso aislamiento de hongos entomopatógenos (MacLeod et al., 1980).

En el caso de los nemátodos entomopatógenos, y debido a una asociación simbiótica con bacterias, los medios de cultivo desarrollados incluyen nutrientes para este organismo procariótico y esterol para el desarrollo de los nemátodos (Lacey, 2012).

Cuadro 2 • Medio de cultivo de tejidos de insectos Grace (1962)

Medio de cultivo de tejido de insectos (mg/100 ml)			
Sales		Azucares	
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	114	Sacarosa (g)	2.668
NaHCO ₃	35	Fructosa	40
KCl	224	Glucosa	70
CaCl ₂ (separado)	100		
MgCl ₂ ·6H ₂ O	228		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	278		
Amino ácidos		Ácidos orgánicos	
L-arginina	70	Ácido málico	67
Ácido L-aspártico	35	Ácido α-cetoglutarico	37
L-asparagina	35	Ácido succínico	6
L-alanina	22.5	Ácido fumárico	5.5
B-alanina	20		
L-cisteína	2.5	Antibióticos	
L-ácido glutámico	60	Penicilina	3
L-glutamina	60	Estreptomina	10
L-glicina	65	Vitaminas	
L-histidina	250	Vitamina B1	0.002
L-isoleucina	5	Vitamina B2	0.002
L-leucina	7.5	Vitamina B5	0.002
L-lisina	62.5	Vitamina B6	0.002
L-metionina	5	Acido p-amino benzoico	0.002
L-prolina	35	Ácido fólico	0.002
L-fenilalanina	15	Vitamina B3	0.002
DL-serina	110	Isoinositol	0.002
L-tirosina	5	Biotina	0.001
L-triptófano	10	Cloruro de colina	0.02
L-treonina	17.5		
L-valina	10		

Además, se han desarrollado medios para cultivar por separado a la bacteria del nemátodo. Como el medio mínimo para *Photorhabdus* (Sambrook et al., 1989) y el medio para *Xenorhabdus* (Woodring y Kaya, 1988):

Agar nutritivo *Xenorhabdus*

3g de extracto de carne de res

5g de peptona

15g de agar

1 L de agua destilada

Los ingredientes se mezclan en el agua y la mezcla se hierve hasta la disolución del agar. Finalmente el medio se esteriliza durante 15

minutos a 121°C.

Medio mínimo para *Photorhabdus* (Sambrook et al., 1989)

Preparar una solución estéril de:

2 ml L⁻¹ de MgSO₄ 1 M

10 ml de glucosa al 20%

0.1 ml L⁻¹ de CaCl₂ 1 M

Posteriormente, agregar la solución estéril a los siguientes ingredientes:

6 g Na₂HPO₄

3 g KH₂PO₄

0.5 g NaCl

1 g NH₄Cl

Medio para cultivo *in vitro* de nemátodos

50 g de hígado de res molido

50 g de riñón de res molido

2.5 g de NaCl

500 ml de agua

7.5 g de agar

Otros medios se han desarrollado a base de alimento para perros y menudencias de pollo (Bedding, 1984).

Para la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* se emplea el medio UG compuesto por:

7.5 g de Bacto peptona

100 ml de Solución de fosfato de potasio

10 ml de Solución stock a

10 ml de Solución stock b

10 ml de Solución stock c

870 ml de Agua destilada

Ajustar a pH 7.4 y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Solución stock a:

12.3 g de MgSO₄·7H₂O

0.17 g de Mn SO₄·1H₂O

1.4 g de ZnSO₄·7H₂O

Solución stock b:

2 g de Fe₂(SO₄)₃

105 ml de Agua destilada

3 ml de H₂SO₄

Solución stock c:

14.7 g de CaCl₂·H₂O

1 l de Agua destilada

Solución de fosfato de potasio

68 g de KH₂PO₄^[1]

1 l de agua destilada

13.5.2 Biofungicidas

Así como algunos organismos tienen el potencial de afectar el desarrollo de los insectos, también los hongos se pueden ver afectados por otros organismos. Hongos pertenecientes al género *Trichoderma* (Perveen y Bokhari, 2012) y bacterias como *Bacillus subtilis* (Shmiedeknecht et al., 1998), han mostrado ser capaces de antagonizar diferentes hongos fitopatógenos e incluso nemátodos (Ruiz et al., 2014). Por ello, diferentes medios se han

empleado para el crecimiento de estos antagonistas (Kishor et al., 2014) como por ejemplo el Preinoculo de *Bacillus subtilis* (Martínez et al., 2016): Inocular *B. subtilis* en un tubo de ensayo con 5 ml de medio LB; Incubar en una agitadora orbital a 200 rpm durante 18 horas a 38°C. Para el Crecimiento de *B. subtilis* se agrega 1 ml del preinoculo en 100 ml de medio LB; Incubar en agitadora orbital a 200 rpm durante 24 horas a 30 °C y finalmente para la producción de esporas de *B. subtilis* se utilizan 100 ml de medio DSM esterilizándolo a 121 °C durante 15 minutos y posteriormente agregar soluciones filtradas y esterilizadas de:

1 ml de 1 M Ca (NO₃)₂

1 ml de 10 mM MnCl₂·4H₂O

1 ml de 1 mM FeSO₄

Incubar a 200 rpm a 30 °C durante 72 horas

Medio para *T. harzianum* (Abiodun y Damilola, 2018)

2 g L⁻¹ de NH₄Cl

4 g L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O

14 g L⁻¹ de K₂HPO₄

2 g L⁻¹ de CaCl₂

4 g L⁻¹ de KH₂PO₄

4.5 g L⁻¹ de extracto de levadura

2 ml de elementos traza [ZnSO₄·7H₂O (0.0014), FeSO₄·7H₂O

(0.005), MnSO₄ (0.0016), CoCl₂ (0.002)]

7.5 g L⁻¹ de glucosa

6 g L⁻¹ de NaNO₃

5 g L⁻¹ de Licor de maíz fermentado

13.5.3 Bioherbidas

Por otro lado, y al igual que las plantas de interés agrícola, las llamadas plantas arvenses también se ven afectadas por organismos patogénicos para ellas, lo que se puede aprovechar como agentes herbicidas.

De los organismos más sobresalientes como bioherbidas destacan algunas *Pseudomonas* (Harding y Raizada, 2015). Estas bacterias son clasificadas como alelopáticas debido a la síntesis y liberación de metabolitos fitotóxicos en la rizosfera, los cuales afectan de manera directa al desarrollo de las plantas, inclusive, a aquellas bacterias que afectan la germinación de semillas de malas hierbas (Inderjit y Mukerji, 2006).

Medio para *Pseudomonas syringae* (Yucel et al., 1989)

Caldo King B a 25 °C

50 ug ml⁻¹ de estreptomycin

25 um ml⁻¹ de tetraciclina

160 ug ml⁻¹ de rifampicina

50 ug ml⁻¹ de ácido nalidíxico

13.6 MICROELEMENTOS EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE MICROORGANISMOS

Todos los microorganismos obtienen sus nutrientes de fuentes variadas, lo que significa que pueden desarrollarse a partir de una amplia variedad de compuestos, siempre y cuando contengan los elementos constituyentes para su crecimiento. Organismos como los hongos requieren una gran proporción de carbono, nitrógeno, hidrogeno, oxigeno, potasio, fosforo, magnesio y azufre (Steinberg, 1939).

En el caso de los hongos entomopatógenos, los requerimientos mayores corresponden al

oxígeno, agua, una fuente orgánica de carbono y energía y una fuente de nitrógeno tanto orgánico como inorgánico (Samson et al., 1988).

Debido a la gran proporción de carbono en la mayoría de los organismos, este puede obtenerse de diversas fuentes y en distintas formas. La mayoría de los organismos utilizan azúcares simples como la glucosa y fructosa como fuente de carbono.

En el caso del nitrógeno, tanto hongos como bacterias suelen requerirlo como un macronutriente, y del mismo modo que el carbono, se puede obtener de diversas fuentes.

Por otro lado, existe una variedad de nutrientes elementales que, aunque son requeridos en menor proporción, son cruciales para el desarrollo de los microorganismos (Steinberg, 1939). Los nutrientes que enseguida se describen, se encuentran presentes en proporciones ya especificadas en medios de cultivo de diferentes organismos (ver en sección 4).

Calcio (Ca):

Los requerimientos de este elemento no son uniformes en los microorganismos, por ejemplo, en algunos hongos y levaduras este nutriente parece ser un elemento esencial para su desarrollo (Steinberg, 1939).

Se ha demostrado, que este nutriente en conjunto con otros elementos traza, proporcionan incrementos en el crecimiento de hongos como *Aspergillus flavus* y *Rhizopus nigricans* (Lockwood, 1933).

En el caso de la bacteria fijadora de nitrógeno *Rhizobium trifolii*, Vincent (1962) determinó que una deficiencia de calcio ocasionó una disminución en la tasa de crecimiento y además, una reducción total del nivel máximo de crecimiento y de cantidad de células viables,

considerando una deficiencia de Ca a una concentración menor a 0.025 mM.

Por otro lado, en el hongo entomopatógeno *B. bassiana*, el Ca junto con otros elementos, tiene una función de actividad enzimática al ser requeridos para la actividad de la enzima β -galactosidasa (Mondal et al., 2016).

Hierro (Fe):

Este elemento es esencial para todas las formas de vida debido a que participa en muchos procesos celulares, por lo que adquirirlo es crucial para el óptimo crecimiento de los organismos. De las funciones más sobresalientes del Fe, es que este está directamente relacionado con el transporte de oxígeno (Symeonidis y Marangos, 2012).

En la bacteria *Photorhabdus luminescens*, simbiote de nemátodos entomopatógenos pertenecientes al género *Heterorhabditis*, el Fe juega un papel relevante en la virulencia de la misma. Watson et al (2010) sugieren que durante el proceso de patogenicidad se lleva a cabo la absorción de este elemento.

Por otro lado, el Fe es de tal importancia para algunas bacterias como *B. subtilis*, que han desarrollado mecanismos que implican la síntesis de metabolitos, para la absorción de este nutriente (Peters y Warren, 1970).

En los medios para cultivo de bacterias y hongos el Fe puede proveerse a través de moléculas conteniendo el elemento en proporciones relevantes, e incluso, se encuentra presente en el agar en pequeñas proporciones (Leonian y Greene, 1940).

Zinc (Zn):

El Zn ha sido empleado para elaborar medios de cultivo de diferentes organismos. Se ha demostrado que al utilizarlo (en conjunto con el

Fe, y Mn) se incrementa el peso seco de algunos hongos (Blank, 1941) y, se considera que juega un rol importante en la oxidación y reducción en los procesos metabólicos de los hongos (Foster, 1939), además de estar implicado en actividad enzimática (Walker y White, 2017) y en la síntesis de antibióticos por algunos actinomicetos (Chesters y Rolinson, 1951).

Por otro lado, este elemento resulta ser tóxico para algunos organismos a ciertas concentraciones, por lo que se ha empleado para la elaboración de medios para el aislamiento de hongos resistentes a bajas concentraciones de Zn (0.01-0.045 M), como resultaron ser algunos hongos entomopatógenos (Dalé y Vaidilute, 2012).

Cobre (Cu):

Dentro de los elementos traza que forman parte importante de la nutrición de los microorganismos se encuentra el cobre, aun cuando se ha dado a conocer que el Cu es tóxico e incluso a bajas concentraciones para algunos, para otros es, un elemento que cumple funciones transcendentales en su fisiología. Se ha demostrado que el Cu tiene una alta especificidad en los procesos de esporulación en algunas bacterias del género *Bacillus* (Weed, 1962). Por otro lado, este mismo elemento puede causar efectos contrarios en organismos de naturaleza similar, como es el caso de los nemátodos entomopatógenos de las familias Heterorhabditidae y Steinernematidae. Por ejemplo, el nemátodo *Steinernema carpocapsae* es susceptible a bajas concentraciones de Cu, mientras que el nemátodo *Heterorhabditis bacteriophora* no se ve afectado a las mismas condiciones (Jaworska y Tomasik, 1999). Además, la bacteria *Photorhabdus* simbiote de *Heterorhabditis* spp. acumula este elemento para activar enzimas involucradas en su potencial de virulencia (Meligy, 2018).

En el caso del cultivo de hongos, el Cu es un inhibidor de crecimiento de estos organismos, sin embargo, los hongos entomopatógenos son la excepción, por lo que agregar Cu al medio de cultivo ha sido empleado para elaborar medios selectivos para el aislamiento de hongos entomopatógenos (Dalé y Vaidilute, 2012).

Otros:

El manganeso (Mn) es un micronutriente esencial para el desarrollo de bacterias, hongos y otros organismos (Barboza et al., 2016). En la bacteria *Bacillus stearothermophilus*, una concentración de 10-30 μM de Mn^{2+} en el medio de cultivo logró altos rendimientos de producción de esporas (Cheung et al., 1982).

Por otro lado el molibdeno (Mo) es importante para la asimilación de nitrógeno por bacterias, principalmente, debido a su presencia en la enzima nitrogenasa (Glass et al., 2012).

Por último, nutrientes de naturaleza vitamínica como la biotina y tiamina son también necesarios en pequeñas cantidades (Samson et al., 1988).

Estos micronutrientes pueden encontrarse en materiales relativamente sencillos de conseguir como la proteína hidrolizada o extracto de levadura (Samson et al., 1988).

13.7 BIBLIOGRAFÍA

- Abiodun AO., Damilola OS.** 2018. Mycelia Growth and Spore Yield of *Trichoderma harzianum* in Batch and Fed-Batch Cultures: Influence of pH and Temperature. *International Journal of Current Microbiology and Apply Science*, 7(4): 627-635
- Ahmadi, A., Azadfar, D., Mofidabadi, A.J.** Study of inter-generic hybridization possibility between *Salix aegyptiaca* and *Populus caspica* to achieve new hybrids. *International Journal of Plant Production*, 4(2):143-147, 2010.
- Akin-Idowu, PE., Ibitoye, DO., Ademoyegun, OT.** Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *African Journal of Biotechnology*, 8 (16): 3782-3788, 2009.
- Aranda-Peres, AN., Pinheiro, MA., Pereira, LEP., Namita, EH.** Adjustment of Mineral Elements in the Culture Medium for the Micropropagation of Three *Vriesea* Bromeliads from the Brazilian Atlantic Forest: The Importance of Calcium. *HortScience*, 44(1):106-112, 2009.
- Asmita, VG., Singh, SK., Gilhotra R.** Plant tissue culture- A Review. *Journal of Pharmaceutical Research and Education*, 2 (1): 217-220, 2017.
- Barboza, NR., Guerra, SR., Leao, VA.** Mechanisms of manganese bioremediation by microbes: an overview. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91: 2733-2739, 2016.
- Bardar, S., Kaul, VK., Kachhwaha, S., Kothari, SL.** Nutrient optimization for improved *in vitro* plant regeneration in *Eclipta alba* (L.) Hassk. and assessment of genetic fidelity using RAPD analysis. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 24: 223-234, 2015.
- Bedding, R.A.** Large-scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis*. *Annual of Apply Biology*, 101:117-120, 1984.
- Blank, LM.** Response of *Phymatotrichum omnivorum* to certain trace elements. *Journal of Agriculture Research*, 62: 129-159, 1941.
- Calva, CG., Rios, LE.** Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. En: Rodríguez V. R., Calva C. G., Ramos R. E. G., Salazar M. A. (Eds.) Aspectos aplicados de la biotecnología. pp 267-301, 1999.
- Cassells, AC., Doyle, BM.** Pathogen and biological contamination management: the road ahead. In: *Plant Cell Culture Protocols* (eds. Loyola-Vargas V M and Vázquez-Flota F), Humana Press. New York, USA. 35-50, 2005.
- Chester, CGC., Rolinson, GN.** Zinc in the metabolism of a strain of *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology*, 5: 559-565, 1951.
- Cheung, HY., Vitkovic, L., Brown, RW.** Toxic Effect of Manganese on Growth and Sporulation of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of General Microbiology* 128, 2345-2402, 1982.
- Chu, CC., Wang, CC., Sun, CS., Hsu, C., Yin, KC., Chu, C.** Establishment of an efficient medium for anther cultures of rice through comparative experiments on nitrogen sources. *Science Sinica*, 18: 659- 668, 1975.
- Conci, VC.** Utilización de cultivo de tejidos para la obtención y conservación de plantas libres de enfermedades. Parte V, Capítulo 9 del libro “Biotecnología y mejoramiento vegetal II”, ArgenBio, Argentina, pp. 481-494, 2010.
- Dalé, P., Vaidiluté, D. V.** 2012. Effect of zinc and copper on cultivable populations of

- soil fungi with special reference to entomopathogenic fungi. *Ekologija*.58 (2) 65–85.
- Foster, JW.** The heavy metal nutrition in fungi. *The Botanical Review*, 4: 207-240, 1939.
- Gamborg, OL., Miller, RA., Ojima, K.** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151-158, 1968.
- García, R., Morán, R., Somonte, D., Zaldúa, Z., López, A., Mena, CJ.** Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) biotechnology: perspectives and progress. In: *Plant Biotechnology and in vitro Biology in 21st Century.* (eds. Altman A, Ziv M and Shamay I), The Netherlands. 143-146, 1999.
- García-González, R., Quiroz, K., Caligari, PDS., Carrasco, B.** Plant tissue culture: current status, opportunities and challenges. *Ciencia e Investigación Agraria*, 37:5-30, 2010.
- Gil, GH., Choo, HY., Gaugler, R.** Enhancement of entomopathogenic nematode production *in vitro* liquid culture of *Heterorhabditis bacteriophora* by fed-batch culture with glucose supplementation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58:751–755, 2002.
- Glass, JB., Axler, RP., Chandra, S., Goldman, CR.** Molybdenum limitation of microbial nitrogen assimilation in aquatic ecosystems and pure cultures. *Frontiers in Microbiology*, 3: 331-342, 2012.
- Gómez-Torres, LM., Moreno-Gómez, B., Velásquez-Lozano, ME., Aguirre-Mancilla, C., Aguado-Santacruz, GA.** Plant cell photoautotrophic suspension cultures. Establishment and application perspectives. *Revista de Fitotecnia Mexicana*, 37(2):165-79, 2014.
- Grace, TDC. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature* (London), 195: 788-789, 1962.
- Green, SJ., Prakash, O., Akob, DM., Gihring, TM., Jardin, P., Watson, DB., Kostka JE.** Denitrifying bacteria isolated from terrestrial subsurface sediment exposed to mixed contamination. *Applied of Environmental Microbiology*, 76:3244–3254, 2010.
- Gupta, S., Dikshit, AK.** Biopesticides: An ecofriendly approach for pest control. *Journal of Biopesticides*, 3(1): 186 -188, 2010.
- Haberlandt, G.** Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien. Math.- Naturwiss. Kl. Abt. J.* 111: 69-92, 1902.
- Harding, DP., Raizada, MN.** Controlling weeds with fungi, bacteria and viruses: a review. *Frontiers in Plant Science*, 6:659-673, 2015.
- Harding, K.** Genetic integrity of cryopreserved plant cells: A review. *CryoLetters*, 25:3-22, 2004.
- Hussain, MK., Anis, M.** Rapid *in vitro* multiplication of *Melia azedarach* L. (a multipurpose woody tree). *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(4): 765-772, 2009.
- Inderjit, Mukerji, KG.** Allelochemicals: Biological Control of Plant Pathogens and Diseases. India, Springer, Volume 2, pp.214, 2006.
- Jain, P., Kachhwaha, S., Kothari, S. L.** Optimization of micronutrients for the improvement of the *in vitro* plant regeneration of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Indian J Biotechnol*, 11: 486-490, 2012.
- Jaworska, M., Tomasik, P.** Metal-metal interactions in biological systems. Part VI. Effect of some metal ions on mortality, pathogenicity and

- reproductivity of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* entomopathogenic nematodes under laboratory conditions. *Water Air Soil Pollution*, 110, 181–194, 1999.
- Kalpana, M., Anbazhagan, M., Natarajan, V., Dhanavel, D.** Improved micropropagation method for the enhancement of biomass in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Recent Research in Science and Technology*, 2(1): 8-13, 2009.
- Kishor ChK., Azariah B., Mitali B., Ashif A.** Evaluation of Culture Media for Biomass Production of *Trichoderma viride* (KBN 24) and their Production Economics. *American Journal of Agriculture and Forestry*, 2 (6): 317-320, 2014.
- Kostka, JE., Prakash, O., Overholt, W., Green, S., Freyer, G., Canion, A., Delgardio, J., Norton, N., Huettel, M.** Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill. *Applied of Environmental Microbiology*, 77:7962–7797, 2011.
- Kowalska, U., Szafranska, K., Krzyzanowska, D., Kiszczak, W., Górecki, R., Janas, K., Górecka, K.** Effect of increased copper ion content in the medium on the regeneration of androgenetic embryos of carrot (*Daucus carota* L.). *Acta Agrobotanica*, 65(2): 73-81, 2012.
- Kremer, RJ.** The role of Bioherbicides in weed management. *Biopesticides International*, 1: 127–141, 2005.
- Lacey, LA.** *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. IP Consulting International Yakima, Washington, USA, 2012.
- Lal, R., Pandey, G., Sharma, P., Kumari, K., Malhotra, S., Pandey, R., Raina, V., Kohler, HP., Holliger, C., Jackson, C., Oakeshott, JG.** Biochemistry of microbial degradation of hexachlorocyclohexane and prospects for bioremediation. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 74:58–80, 2010.
- Latge, JP.** Croissance et sporulation de 6 espces d'entomophthorales II. influence de diverses sources d'azote. *Mycopathologia*, 7 (1) 53-57, 1975.
- Lee, ECM., DeFossard, RA.** Some factors affecting multiple bud formation of strawberry (*Fragaria ananassa* Duchesne) *in vitro*. *Acta Hort.* 78:187-195, 1977.
- Leonian, LH., Greene, VL.** Studies on the nutrition of fungi. IV. Factors Influencing the Growth of some Thiamin-Requiring Fungi. *American Journal of Botany*, 27 (1) 18-26, 1940.
- Liu, G., Gilding, EK., Godwin, ID.** Additive effects of three auxins and copper on sorghum *in vitro* root induction. *In Vitro Cell Developmental Plant.* 49: 191-197, 2013.
- Liu, ZY., Milner, RJ., McRae, CF., Lutton, G.** The use of dodine in selective media for isolation of *Metarhizium* spp. from soil. *J. Invertebr. Pathol.*, 62, 248-251, 1993.
- Lockwood, LBA** study of the physiology of *Penicillium javanicum* Van Beijma with special reference to the production of fat. *Catholic University of America Biological Serie*, No. 13, 1933.
- MacLeod, DM., Tyrrell, D., Welton, MA.** Isolation and growth of the grasshopper pathogen *Entomophthora grylli*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 36: 85e89, 1980.
- Martínez, AJC., Castro, MC., Sanchez, PP., Gutiérrez, DR., Maldonado, MIE.**

- Development of a powder formulation based on *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 spores for biological control of *Fusarium verticillioides* in maize plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32:75, 2016.
- McCoy, EE., Glaser, RW.** Nematode culture for Japanese beetle control. N.J. Dept. Agric. Circ. 265, 1936.
- Meligy, AMA.** Comparative study of element contents in seven isolates of entomopathogenic nematodes. *Meligy Egyptian Journal of Biological Pest Control* 28:1, 2018.
- Mondal, S., Baksi, S., Koris, A., Vatai, G.** Journey of enzymes in entomopathogenic fungi. *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering* 18: 85-99, 2016.
- Mroginski, L., Sansberro, P., Flaschland E.** Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales. Parte I, Capitulo 1 del libro “Biotecnología y mejoramiento vegetal II”, ArgenBio, Argentina, pp. 17-25, 2010.
- Murashige, T and Skoog, F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15: 473-497, 1962.
- Murashige, T.** Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*, 25: 135-166, 1974.
- Olmos, S., Luciani, G., Galdeano, E.** Micropropagación. Parte IV, Capitulo 1 del libro “Biotecnología y mejoramiento vegetal II”, ArgenBio, Argentina, pp. 353-362, 2010.
- Panattoni, A., Luvisi, A., Triolo, E.** Review: Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11 (1): 173-188, 2013.
- Perveen, K., Bokhari, NA.** Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* isolated from soil of date palm field against *Fusarium oxysporum*. *African Journal of Microbiology Research*, 6(13), 3348-3353, 2012.
- Peters, WJ., Warren, RAJ.** The mechanism of iron uptake in *Bacillus subtilis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 16: 1285-1291, 1970.
- Prakash, O., Shouche, Y., Jangid, K., Kostka, JE.** Microbial cultivation and the role of microbial resource centers in the omics era. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97:51-62, 2013.
- Purnhauser, L., Gyulia, G.** Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 35:131-139, 1993.
- Rezali, IN., Sidik, JN., Saleh, A., Osman, IN., Adam, MAN.** The effects of different strength of MS media in solid and liquid media on *in vitro* growth of *Typhonium flageliforme*. *Asian Pac J Trop Biomed*, 7(2): 151-156, 2017.
- Rivero. BM., Franco, GA., Rodriguez, LE., Santillán, OC., Perez, PA.** Interaction of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* with chlorpyrifos ethyl and spinosad in *Spodoptera frugiperda* larvae. *Pest Management Science*, 74:2047-2052, 2018.
- Roustan, JP., Latche, A., Fallot, J.** Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis; cobalt and nickel. *Plant Cell Rep.* 8:182-185, 1989.
- Ruiz SE, AJ Cristóbal, RA Reyes, SJ Tun, RA García, AJ Pacheco.** *In vitro* antagonistic activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soils of the Yucatan Peninsula against *Macrophomina phaseolina* and *Meloidogyne incognita*. *International Journal of Experimental Botany*, 83: 45-47, 2014.

- Saini, R and Jaiwal, PK.** Age, position in mother seedling, orientation, and polarity of the epicotyl segments of blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) determines its morphogenic response. *Plant Science*, 163 (1): 101-109, 2002.
- Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis, T.** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Samson, RA., Evans, HC., Latgé, JP.** *Atlas of entomopathogenic fungi*. Springer-Verlag, pp. 1988-187, 1988.
- Schwalbert, RI., Maldaner, J., Schwalbert, RIA., da Silva, LOS., Steffen, GPK., Steffen, RB.** Optimization of culture media for *Desmodium incanum* micropropagation. *African Journal of Agricultural Resesearch*, 11: 1062-1070, 2016.
- Seabrook, JEA.** Laboratory culture. En: Staba, E. J. (Ed.) *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. C.R.C. Press, Inc, Boca Raton, Florida, U.S.A. pp 1-20, 1980.
- Shapiro ID., Richou, H., Dolinski, C.** Entomopathogenic Nematode Production and Application Technology. *Journal of Nematology*, 44(2):206–217, 2012.
- Shimazu, M., Sato, H.** Media for selective isolation of an entomogenous fungus, *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Appl. Entomol. Zool.*, 31, 291-298, 1996.
- Shmiedeknecht, G., Bochow, H., Junge, H.** Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. II. Biological control of potato diseases, 105 (4): 376-386, 1998.
- Singh, KK., Gurung, B.** *In vitro* propagation of *R. maddenii* Hook. f. an endangered *Rhododendron* species of Sikkim Himalaya. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37(1): 79-83, 2009.
- Singh, RB.** Current status and future prospects of plant biotechnologies in developing countries in Asia. In: Sasson A, Costarini, editors. *Plant Biotechnologies for Developing Countries*. London, pp.141-162, 1992.
- Spiegel, S., Frison, EA., Converse, RH.** Recent development in therapy and virus-detection procedures for international movements of clonal plant germplasm. *Plant Diseases*, 77: 176-1180, 1993.
- Sree K.S., Varma A.** An Introduction to Entomopathogenic Microorganisms. In: Sree K., Varma A. (eds) *Biocontrol of Lepidopteran Pests*. *Soil Biology*, 43. Springer, Cham, 2015.
- Steinberg, RA.** Growth of Fungi in Synthetic Nutrient Solutions. *Botanical Review*, 5 (6): 327-350, 1939.
- Suman, S.** Plant Tissue culture: A promising tool of quality material production with special reference to micropropagation of banana. *Biochemical and Cellular Archives*, 17 (1): 1-26, 2017.
- Symeonidis, A., Marangos, M.** Iron and Microbial Growth, Insight and Control of Infectious Disease in Global Scenario, Dr. Roy Priti (Ed.), ISBN: 978-953-51-0319-6, InTech, 2012.
- Tazeb, A.** Plant Tissue Culture Technique as a Novel Tool in Plant Breeding: A Review Article. *Environmental Science*, 17(2):111-8, 2017.
- Thorpe, T.** History of plant tissue culture. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 37: 169-180, 2007.
- Tilkat, E., Onay, A., Yildirim, H., Ayaz, E.** Direct plant regeneration from mature leaf explants of pistachio, *Pistacia vera* L. *Scientia Horticulturae*, 121(3), 361-365, 2009.
- Tyrrell, D., y MacLeod, DM.** Spontaneous formation of protoplasts by a species of Entomophthora. *Journal of Invertebrate*

- Pathology, 19: 354-360, 1972.
- Vincent, JM.** Influence of calcium and magnesium on the Growth of *Rhizobium*. Journal of General Microbiology, 28: 653-663, 1961.
- Walker, GM., White, NA.** Introduction to fungal physiology. In: K. Kavangh, ed. Fungi: biology and applications. John Wiley & Sons, 2017.
- Watson, R., Millichap, P., Joyce, SA., Reynolds., Clarke, DJ.** The role of iron uptake in pathogenicity and symbiosis in *Photorhabdus luminescens* TT01. Watson *et al.* BMC Microbiology, 10:177, 2010.
- Weed, LL.** Effects of copper on *Bacillus subtilis*. Department of Microbiology, School of Medicine, Western Reserve University, Cleveland, Ohio, 1962.
- Woodring, JL., Kaya, HK.** Steinernematid and heterorhabditid nematodes: a handbook of techniques. Southern Cooperative Series Bulletin. 331. Fayetteville, AK, 1988.
- Yasin, ZAM., Mahmood, M., Shaharudiin, NA.** Effects of micronutrients (Cu, Zn, Mn, and Fe) on the growth of *Spathoglottis plicata* plantlets. Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology, 98 (1): 5-13, 2017.
- Yucel, I., Xiao, Y., Hutcheson, SW.** Influence of *Pseudomonas syringae* culture conditions on initiation of the hypersensitive response of cultured tobacco cells. Applied and Environmental Microbiology, 1724-1729, 1989.

El ácido salicílico y su participación en el rendimiento y producción de metabolitos en las plantas

14

Vazquez Díaz, David Alejandro; Preciado Rangel, Pablo; Salas Pérez, Lilia; Fortis Hernández, Manuel; Sánchez Bernal, Francisa; Trejo Valencia, Radames.

14.1	Resumen	239
14.2	Introducción	239
14.3	Uso de elicitores	240
14.4	Mecanismo de acción del ácido salicílico en plantas	240
14.5	El ácido salicílico el crecimiento y rendimiento de cultivos	241
14.6	Efectos del AS en la fotosíntesis	241
14.7	Ácido salicílico en el sistema antioxidante	242
14.8	Papel del AS en el daño oxidativo de las plantas	243
14.9	Efecto del AS en la calidad nutracéutica de frutos	243
14.10	Conclusiones	244
14.11	Bibliografía	245

14

El ácido salicílico y su participación en el rendimiento y producción de metabolitos en las plantas

Vazquez Díaz, David Alejandro; Preciado Rangel, Pablo; Salas Pérez, Lilia; Fortis Hernández, Manuel; Sánchez Bernal, Francisca; Trejo Valencia, Radames.

14.1 RESUMEN

Las plantas de manera natural poseen ciertas cantidades de sustancias quimioprotectoras que generan beneficios para la salud humana, condiciones edafoclimáticas estresantes incrementan la cantidad de metabolitos de naturaleza antioxidante, pero disminuye significativamente la producción. El desarrollo de nuevas técnicas de producción que incrementen los rendimientos y la concentración de sustancias quimioprotectora en los cultivos es deseable. Al respecto, el ácido salicílico (AS) es una molécula de señalización que genera efectos positivos en los cultivos al presentar mayores rendimientos incremento en las sustancias quimioprotectoras de los frutos; este elicitador puede ser aplicado foliarmente o en conjunto con la solución nutritiva. Este escrito hace una revisión de literatura de la importancia del ácido salicílico como una molécula de señalización que es viable para incrementar la producción y enriquecer la calidad quimioprotectora de los cultivos.

Palabras clave: Ácido salicílico, rendimiento, sustancias quimioprotectoras.

14.2 INTRODUCCIÓN

Los agricultores para obtener altos rendimientos hacen un uso excesivo de fertilizantes y pesticidas los cuales son un agente de contaminación ambiental y generan efectos nocivos en la salud humana (Campillo *et al.*, 2007). Con el uso de fertilizantes se logran altos rendimientos debido a que genera un crecimiento más rápido en los cultivos (Zamune *et al.*, 2016). En estas condiciones de alta fertilidad el crecimiento es favorecido (Bennett *et al.*, 2012), pero la concentración de los metabolitos secundarios es reducida (Salama *et al.*, 2015; Luciano *et al.*, 2017); ya que al no estar sometidas a alguna condición estresante, como por ejemplo una deficiencia de

nitrógeno además de reducir el crecimiento y producción de biomasa, existe una mayor acumulación de metabolitos secundarios (Sánchez Hernández *et al.*, 2016). Los frutos presentan altos contenidos de nutrientes y metabolitos secundarios (Patra *et al.*, 2013; Conde *et al.*, 2016) también conocidos como compuestos quimioprotectores como los compuestos fenólicos (Salas Pérez *et al.*, 2012), flavonoides, terpenoides, y alcaloides (Aghaei y Komatsu, 2013; Gupta *et al.*, 2017). Estos compuestos tienen el potencial de prevenir enfermedades crónicas y degenerativas (Lu *et al.*, 2017). Investigaciones recientes han indicado en los productos obtenidos orgánicamente se logran frutos con un alto contenido de metabolitos secundarios en comparación con el sistema convencional (Lairon, 2010), así como también en la mejora y preservación del medio ambiente al disminuir el uso de pesticidas (Smith-Spangler *et al.*, 2012). Pero los rendimientos se reducen en más de un 25% con este sistema de producción (Reganold y Wachter, 2016). Actualmente se están utilizando diferentes técnicas para el incremento de los metabolitos secundarios de las plantas como es el uso de enmiendas orgánicas (Omar *et al.*, 2012), soluciones nutritivas orgánicas (Santiago-López *et al.*, 2016), aumentos del potasio en la solución nutritiva (López Martínez *et al.*, 2017), biofortificación con hierro y zinc (Guillén-Molina *et al.*, 2016) y la aplicación de elicitores. Un elicitador se define como molécula de señalización responsable de respuestas fisiológicas y morfológicas (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011), a nivel molecular (Xu *et al.*, 2009). Dentro de estos elicitores se encuentran el ácido jasmonico (JA), ácido abscisico (ABA) (Rincón-Pérez *et al.*, 2016) y ácido salicílico (AS) (Natella *et al.*, 2016). El ácido salicílico forma parte del grupo de compuestos fenólicos que son sintetizados por las plantas (Klessig, 2017) que participa en procesos como la floración, senescencia, respuesta a estrés

abiótico, termogénesis, resistencia a plagas y enfermedades y cierre de estomas (Yan y Dong, 2014; Klessig *et al.*, 2016). Además influye en el rendimiento de los cultivos (Sánchez-Chávez *et al.*, 2011) y estimula la biosíntesis de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante (Dong *et al.*, 2010).

14.3 USO DE ELICITORES

Además de las hormonas vegetales utilizadas comúnmente (citocininas, auxinas, giberelinas, ácido abscísico y etileno), existen otros compuestos reguladores del crecimiento, tal es el caso de los brasinoesteroides, el óxido nítrico, poliaminas, triacontanol, ácido ascórbico, tocoferol, jasmonatos y salicilatos (también conocidos como compuestos de señalización), elicitores o inductores de resistencia, ya que no solo están involucrados en procesos como el crecimiento y desarrollo de la planta, si no también intervienen como medidores de las respuestas de las plantas al medio ambiente (Kim *et al.*, 2008; Hussain *et al.*, 2011). Los elicitores, anteriormente llamados inductores, promueven protección o inducen respuestas de adaptación cuando las plantas están frente algún estrés siendo reconocidos por su inducción en la formación de fitoalexinas (Radman *et al.*, 2004). En la actualidad se reconoce como elíctitor a cualquier compuesto que estimule algún tipo de defensa en las plantas (Vasconsuelo y Boland, 2007), dando mayor importancia al efecto que tiene en el incremento de metabolitos secundarios en las plantas (Sharma *et al.*, 2011).

Los elicitores propician diferentes maneras de defensa en las plantas, tales como; la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), la respuesta hipersensible y la formación de fitoalexinas (Edreva, 2004). La cantidad de información acumulada hoy en día (por medio de diversos tipos de análisis, como: secuencia de genes, expresión de genes-trascricpción, diseño

de proteínas, perfiles de metabolitos y compuestos lípidos, ha llevado a encontrar nuevas señales de cómo las plantas responden al estrés biótico y abiótico, en base a un programa de desarrollo y crecimiento en el ciclo de vida de la planta (formación de nuevos compuestos que estimulan cambios en las plantas para inhibir oxidación, estimular otros compuestos útiles en las plantas, etc.), el cual es enlazado y estimulado por las hormonas, dentro de las cuales se ha puesto mucho interés al grupo de los salicilatos (Gholizadeh y Kohnehrouz, 2010; Ogawa *et al.*, 2010; Purcarea y Cachita-Cosma, 2010).

14.4 MECANISMO DE ACCIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN PLANTAS

El mecanismo de acción de AS puede ser generado por dos diferentes vías enzimáticas que requieren del metabolito primario corismato (Chen *et al.*, 2009). El aminoácido L-fenilalanina es convertido en ácido salicílico por dos vías, una por el intermediario benzoato y la otra mediante el ácido cumárico, a través de una serie de reacciones enzimáticas que son catalizadas por la enzima Fenilalanina Amonio Liasa (FAL) (An y Mou, 2011). A su vez, el corismato puede también ser convertido en AS vía isocorismato, en un proceso de dos pasos que implica la participación de las enzimas Isocorismato Sintasa (ICS) e Isocorismato Piruvato Liasa (IPL) (Wildermuth *et al.*, 2001). La mayoría del AS en la planta es transformado a AS O- β -glucósido (ASG) por medio de una enzima llamada AS glucosil transferasa (ASGT) inducible por patógenos. En plantas de *Arabidopsis*, el AS es sintetizado en cloroplastos, mientras que en tabaco la enzima glucosil transferasa está localizada en el citosol. El ASG, en tabaco, es activamente transportado del citosol hacia la vacuola, donde puede

funcionar como una forma almacenada inactiva que puede ser convertida a AS en caso de ser necesario (Bandurska, 2013). El salicilato de metilo (SMe), es otro derivado del AS y/o su forma glucosilada (SMeG) también puede acumularse en niveles relativamente altos *in vivo* (Park *et al.*, 2007). Se ha demostrado que tanto el SMe como el ASG son biológicamente inactivos, mientras que una forma hidroxilada del AS, el ácido 2,5 dihidroxibenzóico (ácido gentísico), que también se acumula en plantas, puede inducir la expresión de genes *PR* específicos en tomate que no son inducidos por ácido salicílico (Sánchez *et al.*, 2013).

14.5 EL ÁCIDO SALICÍLICO EL CRECIMIENTO Y RENDIMIENTO DE CULTIVOS

En los últimos años, el AS ha sido tema de investigación debido a su papel crucial en la regulación de procesos fisiológicos y bioquímicos durante la vida de las plantas ya que juega un papel clave en la regulación de su crecimiento y productividad (Martín-Mex *et al.*, 2010). El AS cuando es aplicado de forma exógena genera cambios en las concentraciones de los compuestos celulares que conducen a una adaptación de la planta ante un factor adverso (biótico o abiótico), provocando un mejor desarrollo de la planta induciendo cambios en la anatomía de estas (Dempsey *et al.*, 2011). Al respecto hay investigaciones que reportan los efectos del ácido salicílico aplicado en los cultivos; aumenta el número de flores, la aparición temprana de estas y un incremento en la biomasa (Sánchez-Chávez *et al.*, 2011b). Anchondo-Aguilar *et al.*, (2011) encontraron que las aplicaciones de ácido salicílico en la floración puede sustituir el estímulo del fotoperiodo. Además, el AS incrementa la producción de frutos, mayor contenido de clorofila y una mayor acumulación fotosintética lo cual influye de forma positiva en el

crecimiento y rendimiento por planta (Larqué-Saavedra *et al.*, 2010). Este efecto se pudiera deber a un incremento en el sistema radical de las plantas, lo cual favorece la absorción de agua y nutrientes (Tucuch Haas *et al.*, 2015). Larqué-Saavedra y Martín-Mex (2007) menciona que aplicaciones de bajas concentraciones de AS a plantas de importancia hortícola como tomate, pepino y chiles incrementa su productividad, hecho que se ha relacionado con el efecto de incrementar el sistema radical de las plantas (Echevarría-Machado *et al.*, 2007). (Vázquez Díaz *et al.*, 2016) reportaron que aplicaciones de AS al medio del cultivo en tomate superan en 34% al control. (Sánchez-Chávez *et al.*, 2011a) aplicaron diversas dosis de AS y encontraron que aplicaciones de 0.2 mM incrementa la producción de chile jalapeño en 36 % en comparación al tratamiento testigo. (Sultan *et al.*, 2016), encontraron que con aplicaciones 0.18 mM de AS en el cultivo de pepino se incrementa el rendimiento en 38% comparado con el tratamiento control. Se han reportado investigaciones con aplicaciones de AS en donde presentan un aumento en la floración en un 37% en comparación al testigo, sino que también indujo una precocidad en la floración. Ha sido publicado que en *Petunia hybrida* aplicaciones de concentraciones de 1 μ M de AS incrementa en 72% el número de flores por planta, y en *Carica papaya* se reporta un incremento de 20% de flores hermafroditas con aplicaciones de 0.01 μ M (Martín-Mex *et al.*, 2012).

14.6 EFECTO DEL AS EN LA FOTOSÍNTESIS

El ácido salicílico es un compuesto fenólico presente en todos los órganos vegetales de las plantas (Sepúlveda *et al.*, 2015). Tiene impacto significativo tanto en el desarrollo y crecimiento de la planta (Guzmán-Antonio *et al.*, 2012), como en los procesos de fotosíntesis al mejorar la actividad

de los cloroplastos y transpiración ya que está relacionado con la toma y transporte de iones, así como con, la estructura de los cloroplastos y la anatomía de la hoja. Además acelera la actividad de la enzima ribulosa-1.5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa, aumentando la actividad fotosintética (Hayat *et al.*, 2012); ya que incrementa el contenido de clorofila a y b, de carotenoides y de carbohidratos; Sin embargo, altas concentraciones de AS (1-5 mM) causan una reducción en la tasa fotosintética y la actividad de la ribulosa-1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa en plantas de cebada y reducen el contenido de clorofila en frijol, trigo y Arabidopsis (Yusuf *et al.*, 2013). La aplicación de AS induce alteraciones en la anatomía de la hoja; en la epidermis y del tejido del mesófilo (Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011), tales cambios se correlacionan con un aumento en volumen de cloroplasto, hinchazón de tilacoides. Así, la actividad fotosintética disminuida con altas concentraciones de AS es debido a sus efectos en las membranas tilacoides y reacciones vinculadas a ellos (Uzunova y Popova, 2000). El ácido salicílico activa la síntesis de carotenoides y mejora la tasa fotosintética neta, la concentración interna de CO₂, conductancia estomática, tasa de transpiración y mejora el uso eficiente del agua en Brassica juncea (Fariduddin *et al.*, 2003). La aplicación foliar de ácido salicílico en soya mejoró el uso eficiente del agua, índice de transpiración y la concentración interna de CO₂ (Yusuf *et al.*, 2013). Al tratar soya con AS alivió la pérdida de la tasa fotosintética neta bajo estrés por calor, al parecer en parte a través de mantener una mayor de activación de la Rubisco y una mayor eficiencia en el PSII (Wang *et al.*, 2010). Sin embargo, y contrariamente a estos resultados, la tasa de transpiración disminuye significativamente en *Phaseolus vulgaris* y *Commelina communis* después de la aplicación foliar de AS y esta disminución en la tasa de transpiración se

atribuyó al cierre estomático (Khokon *et al.*, 2010).

14.7 ÁCIDO SALICÍLICO EN EL SISTEMA ANTIOXIDANTE

Se ha reportado que el AS conjuntamente con el ácido jasmónico regulan la biosíntesis de metabolitos secundarios (Falcioni *et al.*, 2014). El AS pertenece a un grupo muy diverso de sustancias conocidas como compuestos fenólicos, está presente en las plantas y forma parte del grupo de los salicilatos, cuya característica química los relaciona por presentar el radical 2-hidroxibenzoico como el ácido acetilsalicílico y el metilo de AS (Villanueva-Couoh *et al.*, 2009). Los antioxidantes son compuestos capaces de detener biológicamente a las especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas durante el estrés oxidativo radical libre. Los ROS son generados en condiciones aerobias durante el metabolismo normal de la célula, pero altos niveles de esas moléculas pueden ocurrir durante el estrés oxidativo, donde su acumulación depende del balance en la formación de ellos y la formación de los compuestos que los controlan (Mittler *et al.*, 2004). Exposición de las plantas a alta irradiación, temperaturas extremas, inundaciones, ozono, dióxido de sulfuro, salinidad, sequía, patógenos, daños mecánicos, así como la duración de la exposición, la intensidad o grado de esta, han sido reportados como inductores de la formación de ROS. El estrés oxidativo puede ser uno de los efectos generados en diversos tipos de estrés (Noreen y Ashraf, 2009). Como medida de defensa ha sido bien establecido que las plantas generan antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes enzimáticos comúnmente conocidos son: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peróxido dismutasa (POD), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión reductasa (GR), mientras que los antioxidantes no enzimáticos

son: glutatión (GSH), ascorbato (AsA), carotenoides, fenoles, flavonoides, ácido ascórbico y tocoferol, entre otros (Gupta y Sharma, 2006).

El grupo de los salicilatos, incluye el ácido salicílico, el cual se encuentra de forma natural en las plantas desempeñando papeles importantes en cuanto a crecimiento, además de participar como parte de las señales internas que regulan la respuesta de la defensa de las plantas contra condiciones bióticas, y abióticas (Martín-Mex *et al.*, 2013). Se ha determinado que al aplicar el AS de forma exógena, este, induce tolerancia al estrés, mejorando la respuesta biológica de la planta frente a factores adversos de crecimiento, estimulando cambios en las concentraciones de una gran cantidad de compuestos de la planta, dentro de los cuales se puede mencionar a los antioxidantes o capacidad antioxidante total (Sandoval-Rangel *et al.*, 2011a).

14.8 PAPEL DEL AS EN EL DAÑO OXIDATIVO DE LAS PLANTAS

El daño o estrés oxidativo se presenta cuando la producción de especies activas de oxígeno (EAO) supera la capacidad de los sistemas antioxidantes y de captura de radicales libres de la célula. Normalmente el nivel de EAO es alto cuando la planta se ve sometida a alguna condición de estrés biótico o abiótico. Aunque la presencia de EAO causa daño por oxidación de ADN, lípidos y proteínas, las plantas también hacen uso de las EAO en la disipación energética y como señalizadores desencadenantes de respuestas de adaptación y defensa (Alvarez, 2000). A su vez estas últimas se asocian con cambios morfológicos y fisiológicos de la planta (Inzé y Van Montagu, 1995). Es muy probable que el ácido salicílico tenga algún papel regulador sobre el balance de oxidación-reducción de las células vegetales, y ello tal vez explique la

capacidad del AS de incluir respuestas tan variadas: como las respuestas fisiológicas, morfogénicas y adaptativas de la planta. Lo anterior se sigue a partir del comprobado efecto del AS sobre la actividad de la catalasa y otras enzimas que controlan el nivel de los EAO (Raskin, 1992). Se ha hecho mención que el ácido salicílico se sintetiza por la vía del metabolismo fenilpropanoide desde ácido cinámico y ácido benzoico. Se acumula intracelularmente en un receptor específico o se une a la enzima catalasa, normalmente la catalasa protege a la planta contra el estrés oxidativo ejercido por las especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, esta actividad de la catalasa es bloqueada por la unión del ácido salicílico (Chen *et al.*, 1993). Así que, alterando la cantidad de ácido salicílico dentro de la célula, se puede regular el nivel de las especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno. Si solamente una pequeña cantidad de ácido salicílico está presente en la célula, y poco unido a la catalasa, su actividad permanece alta, manteniendo el nivel de especies reactivas de oxígeno bajo. Cuando los niveles de ácido salicílico son altos y la actividad de la catalasa baja, el nivel de las especies reactivas de oxígeno permanecen altas liberando la síntesis de proteínas (Camarena-Gutiérrez y De la Torre-Almaráz, 2007).

14.9 EFECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA CALIDAD NUTRACÉUTICA DE FRUTOS

El AS aumenta el contenido de compuestos quimioprotectores en frutos (Dong *et al.*, 2010); ya que el aplicar dosis adecuadas de AS activa el metabolismo secundario y genera un incremento en la síntesis de antioxidantes totales (Larqué-Saavedra *et al.*, 2010). De igual manera, las aplicaciones de AS propician un incremento en la concentración de fenoles y flavonoides (Sánchez *et al.*, 2013), debido a que el AS genera un estrés bioquímico

en la suspensiones celulares y tejidos de la plantas propiciando un incremento en los metabolitos secundarios (Piñeros-Castro *et al.*, 2009), de tal manera que se le atribuye que regulariza la biosíntesis de metabolitos secundarios, como son los compuestos fenólicos y flavonoides (El-Gaied *et al.*, 2013), y por otra parte también se debe a que el AS activa la enzima fenilalanina aminio-liasa siendo esta clave en la biosíntesis de fenoles y flavonoides (Ghasemzadeh *et al.*, 2016). Existen trabajos donde se reporta el efecto inductor del ácido salicílico sobre los antioxidantes de forma aislada, sin embargo, dado que existen diferentes tipos y clases de antioxidantes, es importante conocer la capacidad antioxidante total, la cual es la capacidad acumulada de los componentes que eliminan los radicales libres o ROS (Pellegrini *et al.*, 2003). Al respecto existen algunas investigaciones sobre el tema en diferentes cultivos. Khandaker *et al.*, (2011) encontraron que aplicaciones de (1.0, 0.1 y 0.01 mM) de ácido salicílico en amaranto (*Amaranthus tricolor* L.) incrementa la capacidad antioxidante total en comparación al tratamiento testigo. Huang *et al.*, (2008) reportaron que con aplicaciones de AS (1 y 2 mM) en la etapa de pre cosecha en el cultivo de naranja se mejora la capacidad antioxidante. Sayyari *et al.*, (2011) trataron granadas con AS a concentraciones (0.1, 0.5 y 1.0 mM) antes de refrigerar por periodos de 14 hasta 84 días para encontrar mayor componentes antioxidantes en comparación al control. Wei *et al.*, (2011) aplicaron el AS en espárrago y presento mayor capacidad fitoquímica. Rahmani *et al.*, (2015) aplico diversas dosis de ácido salicílico y encontró un mayor contenido en la concentración de flavonoides en gladiolos. Wang *et al.*, (2015) reportó un incremento en la capacidad antioxidante en frutos de chabacano cuando son tratados con diferentes dosis de AS. Junmatong *et al.*, (2015) encontraron que el AS aplicado en concentraciones de 1mM en el

cultivo de mango incrementa el contenido de fenoles totales en fruto en relación al testigo. Resultados similares fueron reportados por (Javanmardi and Akbari, 2016) al obtener mayor capacidad fitoquímica en frutos de tomate hidropónico con aplicaciones de AS en la solución nutritiva, ya que el suministro de dosis de ácido salicílico tiene ciertos efectos positivos; activando el metabolismo secundario de las plantas e incrementando la síntesis de antioxidantes existentes en los frutos (Huang *et al.*, 2008; Janda *et al.*, 2012; Ghasemzadeh y Jaafar, 2013). Tari *et al.*, (2002) aplico la dosis 10^{-4} M de AS en tomate y reporta que hay un mayor contenido de carotenoides en comparación al control. De igual manera (Szepesi *et al.*, 2009) Szepesi (2008) utilizó la dosis mencionada y observa mayor acumulación de antioxidantes. Ortega-Ortiz *et al.*, (2007) menciona que las aplicaciones del AS incrementa la capacidad antioxidante en frutos de tomate. Aplicar bajas concentraciones de AS aumentan la calidad de frutos en chile, tomate, pepino y papaya (Martín-Mex *et al.*, 2013). Al aplicar dosis 0.2 y 0.4 mM de ácido salicílico se incrementa el contenido de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante (Vázquez Diaz *et al.*, 2016). He y Zhu (2008) reportan que al aplicar la dosis de 1mM en tomate se presenta una mayor actividad antioxidante. De tal manera que las aplicaciones de AS incrementan el contenido de compuestos antioxidantes, contenido fenólico total, flavonoides y capsaicina en chile (Guzman-Tellez *et al.*, 2015; Sandoval-Rangel *et al.*, 2011b; Tucuch-Haas *et al.*, 2017)..

14.10 CONCLUSIONES

La aplicación de ácido salicílico a los cultivos agrícolas provoca un aumento significativo en el rendimiento y contenido de sustancias fitoquímicos. El AS promueve un uso eficiente de la fertilización ya que no es necesario el incremento de la

concentración de nutrientes, lo que representa un ahorro y además se contribuye a la protección del medio ambiente al reducir el uso fertilizante. En relación con la calidad nutracéutica en los frutos, esta se incrementa con las aplicaciones de ácido salicílico ya que activa el metabolito secundario de las plantas lo cual incrementa la síntesis de los compuestos quimioprotectores. El uso del ácido salicílico es una alternativa viable para incrementar la producción y calidad nutracéutica de los cultivos.

14.11 BIBLIOGRAFÍA

- Aghaei, K., and Komatsu, S.** (2013). Crop and medicinal plants proteomics in response to salt stress. *Frontiers in Plant Science* 4.
- Alvarez, M. E.** (2000). Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. In "Programmed Cell Death in Higher Plants", pp. 185-198. Springer.
- An, C., and Mou, Z.** (2011). Salicylic acid and its function in plant immunity. *Journal of integrative plant biology* 53, 412-428.
- Anchondo-Aguilar, A., Núñez-Barrios, A., Ruiz-Anchondo, T., Martínez-Tellez, J., Vergara-Yoisura, S., and Larqué-Saavedra, A.** (2011). Efecto del ácido salicílico en la bioproduktividad de la fresa (*Fragaria ananassa*) cv Aromosa. *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 2, 293-298.
- Bandurska, H.** (2013). Salicylic acid: an update on biosynthesis and action in plant response to water deficit and performance under drought. In "Salicylic Acid", pp. 1-14. Springer.
- Bennett, A. J., Bending, G. D., Chandler, D., Hilton, S., and Mills, P.** (2012). Meeting the demand for crop production: the challenge of yield decline in crops grown in short rotations. *Biological Reviews* 87, 52-71.
- Camarena-Gutiérrez, G., and De la Torre-Almaráz, R.** (2007). Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 13.
- Campillo, R., Jobet, C., and Undurraga, P.** (2007). Optimización de la fertilización nitrogenada para trigo de alto potencial de rendimiento en Andisoles de la región de la Araucanía, Chile. *Agricultura Técnica* 67, 281-291.

- Conde, A., Pimentel, D., Neves, A., Dinis, L.-T., Bernardo, S., Correia, C. M., Gerós, H., and Moutinho-Pereira, J.** (2016). Kaolin Foliar Application Has a Stimulatory Effect on Phenylpropanoid and Flavonoid Pathways in Grape Berries. *Frontiers in Plant Science* 7.
- Chen, Z., Silva, H., and Klessig, D. F.** (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition-including Guide to Scientific Information* 262, 1883-1885.
- Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., and Fan, B.** (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant signaling & behavior* 4, 493-496.
- Dempsey, D. M. A., Vlot, A. C., Wildermuth, M. C., and Klessig, D. F.** (2011). Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis Book*, e0156.
- Dong, J., Wan, G., and Liang, Z.** (2010). Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. *Journal of biotechnology* 148, 99-104.
- Echevarría-Machado, I., Escobedo-GM, R. M., and Larqué-Saavedra, A.** (2007). Responses of transformed *Catharanthus roseus* roots to femtomolar concentrations of salicylic acid. *Plant Physiology and Biochemistry* 45, 501-507.
- Edreva, A.** (2004). A novel strategy for plant protection: Induced resistance. *Journal of Cell and Molecular Biology* 3, 61-69.
- El-Gaied, L. F., Abu El-Heba, G. A., and El-Sherif, N. A.** (2013). Effect of growth hormones on some antioxidant parameters and gene expression in tomato. *GM crops & food* 4, 67-73.
- Falcioni, T., Ferrio, J. P., Del Cueto, A. I., Giné, J., Achón, M. Á., and Medina, V.** (2014). Effect of salicylic acid treatment on tomato plant physiology and tolerance to potato virus X infection. *European journal of plant pathology* 138, 331-345.
- Fariduddin, Q., Hayat, S., and Ahmad, A.** (2003). Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea*. *Photosynthetica* 41, 281-284.
- Ghasemzadeh, A., and Jaafar, H. Z.** (2013). Interactive effect of salicylic acid on some physiological features and antioxidant enzymes activity in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules* 18, 5965-5979.
- Ghasemzadeh, A., Talei, D., Jaafar, H. Z., Juraimi, A. S., Mohamed, M. T. M., Puteh, A., and Halim, M. R. A.** (2016). Plant-growth regulators alter phytochemical constituents and pharmaceutical quality in Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *BMC complementary and alternative medicine* 16, 152.
- Gholizadeh, A., and Kohnehrouz, B. B.** (2010). Activation of phenylalanine ammonia lyase as a key component of the antioxidative system of salt-challenged maize leaves. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 22, 217-223.
- Guillén-Molina, M., Márquez-Quiroz, C., de la Cruz-Lázaro, E., Velázquez-Martínez, J. R., Manuel, J., Parra, S., Carrillo, M. G., and Vidal, J. A. O.** (2016). Biofortificación de frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) con hierro y zinc* Biofortification of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) with iron

- and zinc. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3427-3438.
- Gupta, O. P., Karkute, S. G., Banerjee, S., Meena, N. L., and Dahuja, A.** (2017). Contemporary Understanding of miRNA-Based Regulation of Secondary Metabolites Biosynthesis in Plants. *Frontiers in Plant Science* 8.
- Gupta, V. K., and Sharma, S. K.** (2006). Plants as natural antioxidants.
- Guzmán-Antonio, A., Borges-Gómez, L., Pinzón-López, L., Ruiz-Sánchez, E., and Zúñiga-Aguilar, J.** (2012). Efecto del ácido salicílico y la nutrición mineral sobre la calidad de plántulas de chile habanero. *Agronomía mesoamericana* 23.
- Guzman-Tellez, E., Benavides-Mendoza, A., Flores-Olivas, A., Cabrera-De la Fuente, M., and Diaz-Montenegro, D.** (2015). Residuality of exogenous salicylic acid and effect on catalase activity and total antioxidant capacity in tomato leaves. *African Journal of Agricultural Research* 10, 3893-3900.
- Hayat, Q., Hayat, S., Alyemeni, M., and Ahmad, A.** (2012). Salicylic acid mediated changes in growth, photosynthesis, nitrogen metabolism and antioxidant defense system in *Cicer arietinum* L. *Plant Soil Environ* 58, 417-423.
- He, Y., and Zhu, Z.** (2008). Exogenous salicylic acid alleviates NaCl toxicity and increases antioxidative enzyme activity in *Lycopersicon esculentum*. *Biologia Plantarum* 52, 792.
- Huang, R.-H., Liu, J.-H., Lu, Y.-M., and Xia, R.-X.** (2008a). Effect of salicylic acid on the antioxidant system in the pulp of 'Cara cara' navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) at different storage temperatures. *Postharvest Biology and Technology* 47, 168-175.
- Huang, R., Xia, R., Lu, Y., Hu, L., and Xu, Y.** (2008b). Effect of pre-harvest salicylic acid spray treatment on post-harvest antioxidant in the pulp and peel of 'Cara cara' navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 229-236.
- Hussain, K., Nawaz, K., Majeed, A., Ilyas, U., Lin, F., Ali, K., and Nisar, M.** (2011). Role of exogenous salicylic acid applications for salt tolerance in violet. *Sarhad J. Agric* 27, 171-175.
- Inzé, D., and Van Montagu, M.** (1995). Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 6, 153-158.
- Janda, K., Hideg, É., Szalai, G., Kovács, L., and Janda, T.** (2012). Salicylic acid may indirectly influence the photosynthetic electron transport. *Journal of plant physiology* 169, 971-978.
- Javanmardi, J., and Akbari, N.** (2016). Salicylic acid at different plant growth stages affects secondary metabolites and physico-chemical parameters of greenhouse tomato. *Advances in Horticultural Science* 30, 151-157.
- Junmatong, C., Faiyue, B., Rotarayanont, S., Uthaibutra, J., Boonyakiat, D., and Saengnil, K.** (2015). Cold storage in salicylic acid increases enzymatic and non-enzymatic antioxidants of Nam Dok Mai No. 4 mango fruit. *Month* 41.
- Khandaker, L., Masum Akond, A., and Oba, S.** (2011). Foliar application of salicylic acid improved the growth, yield and leaf's bioactive compounds in red amaranth (*amaranthus tricolor* l.). *Vegetable crops research bulletin* 74, 77-86.
- Khokon, M. A. R., Hossain, M. A., Munemasa, S., Uraji, M., Nakamura, Y., Mori, I. C., and Murata, Y.** (2010). Yeast elicitor-induced stomatal closure

- and peroxidase-mediated ROS production in Arabidopsis. *Plant and cell physiology* 51, 1915-1921.
- Kim, K. S., Min, J.-Y., and Dickman, M. B.** (2008). Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21, 605-612.
- Klessig, D. F.** (2017). How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans? *BMC biology* 15, 23.
- Klessig, D. F., Tian, M., and Choi, H. W.** (2016). Multiple targets of salicylic acid and its derivatives in plants and animals. *Frontiers in immunology* 7.
- Lairon, D.** (2010). Nutritional quality and safety of organic food. A review. *Agronomy for sustainable development* 30, 33-41.
- Larqué-Saavedra, A., and Martín-Mex, R.** (2007). Effects of salicylic acid on the bioproductivity of plants. *Salicylic acid: a plant hormone. Dordrecht: Springer*, 15-23.
- Larqué-Saavedra, A., Martín-Mex, R., Nexticapán-Garcéz, Á., Vergara-Yoisura, S., and Gutiérrez-Rendón, M.** (2010). Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Chapingo. Serie horticultura* 16, 183-187.
- López Martínez, J. D., Salas-Pérez, L., Valenzuela Soto, R., Borroel García, V. J., Preciado Rangel, P., and Ramírez Seañez, A. R.** (2017). Efecto del potasio en el contenido fenólico y capacidad antioxidante de *Ocimum basilicum* L. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8.
- Lu, N., Bernardo, E. L., Tippayadarapanich, C., Takagaki, M., Kagawa, N., and Yamori, W.** (2017). Growth and Accumulation of Secondary Metabolites in *Perilla* as Affected by Photosynthetic Photon Flux Density and Electrical Conductivity of the Nutrient Solution. *Frontiers in Plant Science* 8.
- Luciano, Á.-J., Irineo, T.-P., Virginia, O.-V. R., Feregrino-Pérez, A. A., Hernández, A. C., and Gerardo, G.-G. R.** (2017). Integrating Plant Nutrients and Elicitors for Production of Secondary Metabolites, Sustainable Crop Production and Human Health: A Review. *International Journal of Agriculture & Biology* 19.
- Martín-Mex, R., Nexticapán-Garcéz, Á., Herrera-Tuz, R., Vergara-Yoisura, S., and Larqué-Saavedra, A.** (2012). Efecto positivo de aplicaciones de ácido salicílico en la productividad de papaya (*Carica papaya*). *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 3, 1637-1643.
- Martín-Mex, R., Nexticapán-Garcéz, A., and Larqué-Saavedra, A.** (2013). Potential benefits of salicylic acid in food production. In "Salicylic Acid", pp. 299-313. Springer.
- Martín-Mex, R., Vergara-Yoisura, S., Nexticapán-Garcés, A., and Larqué-Saavedra, A.** (2010). Application of low concentrations of salicylic acid increases the number of flowers in *Petunia* híbrida. *Agrociencia* 44.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Van Breusegem, F.** (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science* 9, 490-498.
- Natella, F., Maldini, M., Nardini, M., Azzini, E., Foddai, M. S., Giusti, A. M., Baima, S., Morelli, G., and Scaccini, C.** (2016). Improvement of the

- nutraceutical quality of broccoli sprouts by elicitation. *Food Chemistry* 201, 101-109.
- Noreen, Z., and Ashraf, M.** (2009). Assessment of variation in antioxidative defense system in salt-treated pea (*Pisum sativum*) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers. *Journal of Plant Physiology* 166, 1764-1774.
- Ogawa, T., Ara, T., Aoki, K., Suzuki, H., and Shibata, D.** (2010). Transient increase in salicylic acid and its glucose conjugates after wounding in *Arabidopsis* leaves. *Plant Biotechnology* 27, 205-209.
- Omar, N. F., Hassan, S. A., Yusoff, U. K., Abdullah, N. A. P., Wahab, P. E. M., and Sinniah, U. R.** (2012). Phenolics, Flavonoids, Antioxidant Activity and Cyanogenic Glycosides of Organic and Mineral-base Fertilized Cassava Tubers. *Molecules* 17, 2378.
- Ortega-Ortiz, H., Benavides-Mendoza, A., Mendoza-Villarreal, R., Ramírez-Rodríguez, H., and De Alba Romenus, K.** (2007). Enzymatic activity in tomato fruits as a response to chemical elicitors. *Journal of the Mexican Chemical Society* 51, 141-144.
- Park, S.-W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., and Klessig, D. F.** (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318, 113-116.
- Patra, B., Schluttenhofer, C., Wu, Y., Pattanaik, S., and Yuan, L.** (2013). Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1829, 1236-1247.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., and Brighenti, F.** (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of nutrition* 133, 2812-2819.
- Pérez-Alonso, N., and Jiménez, E.** (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal* 11.
- Piñeros-Castro, Y., Otálvaro-Álvarez, Á., and Velásquez-Lozano, M.** (2009). Efecto de la aplicación de elicitors sobre la producción de 4 β -hidroxiwithanólido E, en raíces transformadas de *Physalis peruviana* L. *Universitas Scientiarum* 14, 23-28.
- Purcarea, C., and Cachita-Cosma, D.** (2010). Studies regarding the effects of salicylic acid on maize (*Zea mays* L.) seedling under salt stress. *Studia Universitatis Vasile Goldis Seria Stiintele Vietii (Life Sciences Series)* 20.
- Radman, R., Bucke, C., and Keshavarz, T.** (2004). Elicitor effects on reactive oxygen species in liquid cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology letters* 26, 147-152.
- Rahmani, I., Ahmadi, N., Ghanati, F., and Sadeghi, M.** (2015). Effects of salicylic acid applied pre-or post-transport on post-harvest characteristics and antioxidant enzyme activity of gladiolus cut flower spikes. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 43, 294-305.
- Raskin, I.** (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annual review of plant biology* 43, 439-463.
- Reganold, J. P., and Wachter, J. M.** (2016). Organic agriculture in the twenty-first century. *Nature Plants* 2, 15221.
- Rincón-Pérez, J., Rodríguez-Hernández, L., Ruíz-Valdiviezo, V. M., Abud-**

- Archila, M., Luján-Hidalgo, M. C., Ruiz-Lau, N., González-Mendoza, D., and Gutiérrez-Miceli, F. A.** (2016). Fatty Acids Profile, Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity in Elicited Callus of *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. *Journal of Oleo Science* 65, 311-318.
- Rivas-San Vicente, M., and Plasencia, J.** (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of experimental botany* 62, 3321-3338.
- Salama, Z. A., El Baz, F. K., Gaafar, A. A., and Zaki, M. F.** (2015). Antioxidant activities of phenolics, flavonoids and vitamin C in two cultivars of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) in responses to organic and bio-organic fertilizers. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 14, 91-99.
- Salas Pérez, L., Esparza Rivera, J. R., Preciado Rangel, P., Álvarez Reyna, V. d. P., Meza Velázquez, J. A., Velázquez Martínez, J. R., and Murillo Ortiz, M.** (2012). Rendimiento, calidad nutricional, contenido fenólico y capacidad antioxidante de forraje verde hidropónico de maíz (*Zea mays*) producido en invernadero bajo fertilización orgánica. *Interciencia* 37, 215-220.
- Sánchez-Chávez, E., Barrera-Tovar, R., Muñoz-Márquez, E., Ojeda-Barrios, D. L., and Anchondo-Nájera, Á.** (2011a). Efecto del ácido salicílico sobre biomasa, actividad fotosintética, contenido nutricional y productividad del chile jalapeño. *Revista Chapingo. Serie horticultura* 17, 63-68.
- Sánchez-Chávez, E., Barrera-Tovar, R., Muñoz-Márquez, E., Ojeda-Barrios, D. L., and Anchondo-Nájera, Á.** (2011b). Efecto del ácido salicílico sobre biomasa, actividad fotosintética, contenido nutricional y productividad del chile jalapeño. *Revista Chapingo. Serie horticultura* 17, 63-68.
- Sánchez, G. R., Mercado, E. C., de la Cruz, H. R., and Pineda, E. G.** (2013). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo* 12, 90-95.
- Sánchez Hernández, D. J., Fortis Hernández, M., Esparza Rivera, J. R., Rodríguez Ortiz, J. C., de la Cruz Lazaro, E., Sánchez Chávez, E., and Preciado Rangel, P.** (2016). Empleo de vermicompost en la producción de frutos de melón y su calidad nutracéutica. *Interciencia* 41.
- Sandoval-Rangel, A., Benavides-Mendoza, A., Alvarado-Vázquez, M., Foroughbakhch-Pournavab, R., Núñez-González, M., and Robledo-Torres, V.** (2011a). Influencia de ácidos orgánicos sobre el crecimiento, perfil bromatológico y metabolitos secundarios en chile piquín. *Terra Latinoamericana* 29.
- Sandoval-Rangel, A., Benavides-Mendoza, A., Alvarado-Vázquez, M., Foroughbakhch-Pournavab, R., Núñez-González, M., and Robledo-Torres, V.** (2011b). Influencia de ácidos orgánicos sobre el crecimiento, perfil bromatológico y metabolitos secundarios en chile piquín. *Terra Latinoamericana* 29, 395-401.
- Santiago-López, G., Preciado-Rangel, P., Sánchez-Chavez, E., Esparza-Rivera, J. R., Fortis-Hernández, M., and Moreno-Reséndez, A.** (2016). Organic nutrient solutions in production and

- antioxidant capacity of cucumber fruits. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 28, 518.
- Sayyari, M., Castillo, S., Valero, D., Díaz-Mula, H. M., and Serrano, M.** (2011). Acetyl salicylic acid alleviates chilling injury and maintains nutritive and bioactive compounds and antioxidant activity during postharvest storage of pomegranates. *Postharvest Biology and Technology* 60, 136-142.
- Sepúlveda, L. V., Morales, S. G., Valdez-Aguilar, L. A., Ramírez-Godina, F., and Benavides-Mendoza, A.** (2015). Efecto de la aplicación exógena de ácido benzoico y salicílico en el crecimiento de plántulas de tomate, tomatillo y pimiento* Effect of exogenous application of benzoic and salicylic acid on growth of tomato, tomatillo and pepper seedling.
- Sharma, M., Sharma, A., Kumar, A., and Basu, S. K.** (2011). Enhancement of secondary metabolites in cultured plant cells through stress stimulus. *Am J Plant Physiol* 6, 50-71.
- Smith-Spangler, C., Brandeau, M. L., Hunter, G. E., Bavinger, J. C., Pearson, M., Eschbach, P. J., Sundaram, V., Liu, H., Schirmer, P., and Stave, C.** (2012). Are organic foods safer or healthier than conventional alternatives? A systematic review. *Annals of internal medicine* 157, 348-366.
- Sultan, S., Mohamed, M., Abd-elrahim, G. H., and El-basyouny, M. S.** (2016). Growth and yield of cucumber plants derived from seeds pretreated with salicylic acid. *J Boil Chem Environ Sci* 11, 541-561.
- Szepesi, Á., Csiszár, J., Gémes, K., Horváth, E., Horváth, F., Simon, M. L., and Tari, I.** (2009). Salicylic acid improves acclimation to salt stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increases Na⁺ content in leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. *Journal of Plant Physiology* 166, 914-925.
- Tari, I., Csiszár, J., Szalai, G., Horváth, F., Pécsváradi, A., Kiss, G., Szepesi, A., Szabó, M., and Erdei, L.** (2002). Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pre-treatment. *Acta Biologica Szegediensis* 46, 55-56.
- Tucuch-Haas, C., Alcántar-González, G., Trejo-Téllez, L. I., Volke-Haller, H., Salinas-Moreno, Y., and Larqué-Saavedra, A.** (2017). Efecto de ácido salicílico en el crecimiento, estatus nutrimental y rendimiento en maíz (*Zea mays*). *Agrociencia* 51, 771-781.
- Tucuch Haas, C. J., Alcántar González, G., and Larqué Saavedra, A.** (2015). Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de la raíz y biomasa total de plántulas de trigo. *Terra Latinoamericana* 33, 63-68.
- Uzunova, A., and Popova, L.** (2000). Effect of salicylic acid on leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of barley plants. *Photosynthetica* 38, 243-250.
- Vasconsuelo, A., and Boland, R.** (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science* 172, 861-875.
- Vázquez Díaz, D. A., Salas Pérez, L., Preciado Rangel, P., Segura Castruita, M. Á., González Fuentes, J. A., and Valenzuela-García, J. R.** (2016). Efecto del ácido salicílico en la producción y calidad nutracéutica de frutos de tomate. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3405-3414.

- Villanueva-Couoh, E., Alcántar-González, G., Sánchez-García, P., Soria-Fregoso, M., and Larque-Saavedra, A.** (2009). Efecto del ácido salicílico y dimetilsulfóxido en la floración de [*Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Kitamura] en Yucatán. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 15, 25-31.
- Wang, L.-J., Fan, L., Loescher, W., Duan, W., Liu, G.-J., Cheng, J.-S., Luo, H.-B., and Li, S.-H.** (2010). Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves. *BMC Plant Biology* 10, 34.
- Wang, Z., Ma, L., Zhang, X., Xu, L., Cao, J., and Jiang, W.** (2015). The effect of exogenous salicylic acid on antioxidant activity, bioactive compounds and antioxidant system in apricot fruit. *Scientia Horticulturae* 181, 113-120.
- Wei, Y., Liu, Z., Su, Y., Liu, D., and Ye, X.** (2011). Effect of salicylic acid treatment on postharvest quality, antioxidant activities, and free polyamines of asparagus. *Journal of food science* 76.
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F. M.** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414, 562.
- Xu, M., Dong, J., Wang, H., and Huang, L.** (2009). Complementary action of jasmonic acid on salicylic acid in mediating fungal elicitor-induced flavonol glycoside accumulation of *Ginkgo biloba* cells. *Plant, cell & environment* 32, 960-967.
- Yan, S., and Dong, X.** (2014). Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Current opinion in plant biology* 20, 64-68.
- Yusuf, M., Hayat, S., Alyemeni, M. N., Fariduddin, Q., and Ahmad, A.** (2013). Salicylic acid: physiological roles in plants. In "Salicylic acid", pp. 15-30. Springer.
- Zamune, E. C., Lloveras, J., and Echeverría, H. E.** (2016). Dosis óptima económica de fósforo en el cultivo de papa en el sudeste bonaerense. *Ciencia del suelo* 34, 57-65.

BIFORTIFICACIÓN CON MICRONUTRIENTES EN CULTIVOS AGRÍCOLAS

Los nuevos retos de la agricultura es satisfacer la demanda de alimentos, sin embargo, dichos alimentos deben cumplir con la calidad nutricional suficiente para no tener deficiencias de micronutrientes.

Por lo tanto, la Nutrición Mineral de las Plantas juega un papel importante a través de la biofortificación, aumentar el contenido de micronutrientes de los alimentos básicos.

Al presentar esta obra, nuestro deseo es aportar conocimientos nuevos en el área de la Nutrición de Mineral de las Plantas enfocado a la Biofortificación de cultivos agrícolas básicos, dado que es un área relevante en la producción de alimentos, que sin lugar a dudas, seguirá desarrollándose en los próximos años y en la que actualmente continuaremos trabajando para mejorar la calidad nutricional de las cosechas de los cultivos.

