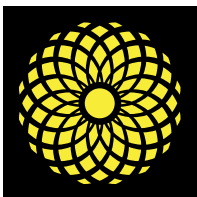


Steviana



Cereus aethiops (Cactaceae) en la Región Occidental - Paraguay



Laboratorio de Recursos Vegetales
Departamento de Biología
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad Nacional de Asunción



La revista *Steviana* es una publicación semestral, del Laboratorio de Recursos Vegetales (LA-REV), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN), la misma fue creada en 2009, y cubre áreas de investigación primaria, en todas las líneas de trabajo en el campo de las ciencias botánicas y áreas relacionadas. Las subsecciones temáticas son: Conservación, Ecología, Etnobotánica y Botánica Económica, Ficología, Fisiología, Biotecnología, Fitoquímica, Flora y Vegetación, Genética y Biología Molecular, Micología, Morfoanatomía Vegetal, Sistemática y Taxonomía, Toxicología, entre otras.

Además *Steviana* publica números especiales, tales como: libros y suplementos con los resúmenes de los trabajos presentados a las Jornadas Paraguayas de Botánica.

Cuenta con dos versiones, una impresa con tirada anual (ISSN 2077-8430) y otra *online* con publicación semestral (ISSN 2304-2907). Se publican investigaciones originales (artículos), revisiones (reviews), notas cortas y una sección de noticias, divulgación de redes y eventos, sin costo para los autores.

La revista se encuentra desde el año 2012 en el catálogo Latindex con N° de Folio 21767, e indexada en Latindex 2.0 desde el año 2022. Así también, forma parte de las siguientes bases de datos, directorios y catálogos *online*: Crossref, ISSN, Google Académico, MIAR, BASE.

La Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN) agradece a los investigadores nacionales e internacionales, que han dedicado su tiempo y esfuerzo incondicional en el arbitraje de los artículos:

Danilo Fernández

Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biotecnología. Paraguay

Nélida Soria Rey

Universidad Nacional de Pilar. Facultad de Ciencias Aplicadas. Paraguay

Christian Vogt

Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biología. Paraguay

Karina Núñez

Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biología. Paraguay

Francisco Ferreira

Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Laboratorio de Recursos Vegetales-área Química Orgánica de los Productos Naturales, Paraguay

Ángel Moreno Fuentes

Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México

Leonardo Beltrán

Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. Departamento Jardín Botánico. Investigador Asociado C., México

Eduardo Villarreal Ramírez

Professor Tissue Bioengineering Laboratory School of Dentistry The National Autonomous University of Mexico, México

Mauricio Ramírez

Departamento de Ciencias Biológicas, Bioprocesos y Biotecnología, Escuela de Ciencias Aplicadas e Industria Sostenible, Facultad de Ingeniería, Diseño y Ciencias Aplicadas, Universidad Icesi, Cali, Colombia.

Stella Maris Romero

Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (IMBIV, CONICET-UNC). Córdoba, Argentina

Laura Ramírez

Profesor Adjunto (UNRC). Investigador Principal (CONICET). Instituto de Investigación en Micología y Micotoxicología (UNRC-CONICET). Ruta 36 KM 601, 5800 Río Cuarto, Córdoba, Argentina



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCION

RECTORA

Prof. Dra. Zully Concepción Vera de Molinas

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DECANO

Prof. Lic. Constantino Nicolás Guefos K., MAE

EQUIPO EDITORIAL

Comité Editorial

Editor

Bonifacia Benítez de Bertoni
(FACEN-LAREV-UNA)

Co-editor

María Vera Jiménez
(FACEN-LAREV-UNA)

Asistente de edición

Pamela Marchi
(FACEN-LAREV-UNA)

Comité Técnico

Diseño y diagramación

Daniel Curtido Benítez
(Dirección de Relaciones Exteriores y Difusión.
FACEN-UNA)

Redes sociales

Pamela Marchi
(FACEN-LAREV-UNA)
Luz M. E. Martínez
(Dirección de Relaciones Exteriores y Difusión.
FACEN-UNA)

Soporte informático

Luis Martínez, Beatriz Casal, Cinthia Franco
(Departamento de Sistemas. FACEN-UNA)

Idioma inglés

Nidia Beatriz Benítez Candia
(FACEN – UNA)

Comité Científico

Asesores Nacionales

María de Fátima Mereles H.

CEDIC, Paraguay

Gloria Yaluff

IICS, Paraguay

Claudia Pereira S.

FACEN-UNA, Paraguay

Miguel Angel Martínez

FACEN-UNA, Paraguay

Michelle Campi G.

FACEN-UNA, Paraguay

Juana De Egea

CEDIC, Paraguay

Asesores Internacionales

Ana Ladio

INIBIOMA. Laboratorio Ecotono. Universidad
Nacional del Comahue, Argentina

Fernando Silla

Universidad de Salamanca. Facultad de Biología,
Área Ecología. Coordinación-Doctorado en Bio-
logía y Conservación de la Biodiversidad, España

José Iranildo Miranda de Melo

Departamento de Biología de la Universidad
Estadual de Paraíba-Campina Grande, Paraíba,
Brasil

DIRECCIÓN OFICIAL

Facultad de Ciencias Exáctas y Naturales-UNA
Telefono-fax: (595-21) 585 600 / Dirección Postal: 1039
Página web: www.facen.una.py
Campus Universitario, San Lorenzo-Paraguay



Steviana, Vol. 14 (1) - 2022

CONTENIDO POR SECCIONES

Florística

- 05-17** *Cereus aethiops* Haw. (Cactaceae) nueva cita para Paraguay
Pin Ferreira, A.; Rodríguez Montiel, L.; Friesen Ratzlaff, V.

Biotecnología

- 18-33** Detección *in silico* de fitomoléculas con potenciales actividades inhibitorias de Nucleolinas (NCL)
Gimenez Vera, S.; Gayozo, E.; Marín, L.
- 34-43** Producción de biomasa líquida de levaduras cerveceras en un medio de cultivo alternativo
Maciel, N.
- 44-54** Effectiveness of biological, botanical and synthetic products in the control of onion (*Allium cepa*) wilt caused by *Fusarium* sp. Resources for integrated management
Díaz-Nájera, J. F.; Ayvar-Serna, S.; Vargas-Hernandez, M.; Sanabria-Velázquez, A. D.; Cerezo-Aparicio, C. M.; Enciso-Maldonado, G. A.

Cereus aethiops Haw. (Cactaceae) nueva cita para Paraguay

Pin Ferreira, A.^{1*} ; Rodríguez Montiel, L.¹; Friesen Ratzlaff, V.²

¹ Cactus y algo más, Asunción, Paraguay

² Investigador independiente

* E-mail del autor: anapinf@gmail.com

Cereus aethiops Haw. (Cactaceae) nueva cita para Paraguay. Se presenta una especie poco conocida en nuestro país. Su distribución se enmarca en el ecosistema chaqueño seco. En el 2017 se realizó la primera colecta botánica para este país, depositada en el herbario de la Colonia Fernheim (Filadelfia). En el 2021 se realizó una nueva colecta y se buscaron registros de la misma en territorio paraguayo en bases de datos electrónicas de herbarios extranjeros. Con este trabajo se confirma la presencia de *C. aethiops* en Paraguay (Departamento de Boquerón); se amplía la información botánica, fenológica y ecológica; se menciona el uso por poblaciones humanas; se presenta un mapa preliminar de distribución. Se presume que *C. aethiops* podría ser un híbrido entre *C. forbesii* Otto ex C. F. Först. y *Monvillea spegazzinii* (F.A.C. Weber) Britton & Rose.

Palabras claves: *Cereus aethiops*, Cactaceae, distribución, flora nativa, Paraguay

Cereus aethiops Haw. (Cactaceae) new record for Paraguay. A little known species is presented for Paraguayan flora. Its distribution is part of the dry Chaco ecosystem. In 2017, the first botanical collection for Paraguay was made and, deposited in the herbarium of the Fernheim Colony (Filadelfia). In 2021, a new collection was made and records of it were searched for in Paraguayan territory in electronic databases of foreign herbaria. With this work, the presence of *C. aethiops* in Paraguay (Department of Boquerón) is confirmed; botanical, phenological and ecological information is expanded; use by human populations is mentioned; and preliminary distribution map is presented. It is presumed that *C. aethiops* could be a hybrid between *C. forbesii* Otto ex C. F. Först. and *Monvillea spegazzinii* (F.A.C. Weber) Britton & Rose.

Keywords: *Cereus aethiops*, Cactaceae, distribution, native flora, Paraguay

INTRODUCCIÓN

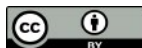
De acuerdo a WFO (World Flora Online) Plant List, el género *Cereus* Mill. cuenta con 52 especies aceptadas, de las 1041 especies descritas. Anderson (2001), Lodé (2015) y Hunt (2016) mencionan entre 25 y 34 especies a nivel global.

La distribución global del género *Cereus* abarca Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Guayana Francesa, Perú, Paraguay, Surinam, Trinidad y Tobago, Uruguay, Venezuela y la región del Caribe (Mamani, 2019). El Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur registra 9 especies de *Cereus* para la región (Zuloaga et al., 2019).

Steviana, Vol. 14 (1), 2022 pp.05-18

Original recibido el 30/04/2022

Aceptado el 13/11/2022



Todo el contenido de esta revista está bajo una Licencia Creative Commons

Cereus aethiops se distribuye desde el límite occidental de Argentina hasta Brasil, teniendo a este último país como localidad tipo (Britton y Rose, 1920). En Argentina se distribuye en las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Córdoba, Entre Ríos, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Neuquén, Río Negro, Salta, Santa Fe, San Juan, San Luis y Tucumán (Catálogo de Plantas Vasculares del Cono Sur; Kiesling, 2005; Trevisson y Demaio, 2006; Trevisson y Perea, 2009; Mamani, 2019). Ochoa et al. (2010) lo citan también para Santiago del Estero, donde mencionan dos variedades: *C. aethiops* var. *lanbeckii* (Phil.) Backeb. y var. *melanacanthus* (K.Schum.) Backeb., las que finalmente son consideradas como sinónimos. De acuerdo a Pizzetti (2003) la var. *lanbeckii* tiene espinas radiales blancas y la var. *melanacanthus* el tallo es color rojo violáceo con espinas centrales más robustas y largas, negras brillantes.

Fuera de la Argentina se lo menciona para Uruguay (Hunt, 1999) y Brasil (“in Brazilia”) (Taylor y Phillips, 1830; Trevisson y Perea, 2009) y hasta la fecha *C. aethiops* no ha sido mencionada para Paraguay.

Britton y Rose (1920) ubican a *C. aethiops* entre los *Cereus* de flores largas (10-20 cm long), de porte bajo y aspecto arbustivo; de artejos no robustos, color azul-grisáceo; de porte “esbelto”. Diferencian a esta especie de otras dos muy similares por no tener las costillas marcadamente onduladas (como *C. azureus*), y por no tener porte arbóreo y presentar areólas distantes (como *C. chalybaeus*), cuya distribución se menciona para Brasil y norte de Argentina, respectivamente.

La primera descripción de *C. aethiops* realizada por Haworth fue en base a caracteres vegetativos (Taylor y Phillips, 1830). De acuerdo a la descripción de Britton y Rose (1920: 17) que traducimos aquí, *C. aethiops* tiene tallos verde-azulados a morados, de 1-2 m de altura; normalmente muy ramificado; artículos de 30 cm o más, a veces estrechándose hacia el ápice; costillas 7 u 8 un poco tuberculadas, obtusas o redondeadas,

separadas por intervalos agudos; areólas anchas, oscuras (“black”); espinas radiales 9 o incluso más; negras, al menos en bases y puntas; espina central usualmente solitaria, un poco más robusta que las radiales, ascendente; flor larga, tubular, de 22 cm long, con el extremo o corola de 12 cm de diámetro; segmentos externos del perianto: linear-lanceolados, rosados; segmentos internos: blancos; filamentos y estilo incluidos, los primeros pegados a lo largo de la superficie interna del largo tubo; fruto ovoide a oblongo-ovoide, más o menos marrón cuando maduro, truncado en el ápice con una corteza fina, suave, levemente glauca, 6 cm long; semillas oscuras (“black”), 2 mm long, toscamente tuberculadas en la parte superior y finamente tuberculadas en la base, con hilum grande y hundido.

Además de las características mencionadas arriba para *C. aethiops*, otros autores agregan las siguientes: arborescente o excepcionalmente arborea (Trevisson y Demaio, 2006; Trevisson y Perea, 2009); hay plantas adultas desde los 0,60 m alt. (Ochoa et al., 2010); tallos cilíndricos, poco hasta muy ramificados, artejos de hasta 70 cm long (a veces más), hasta 5 cm diámetro, apoyantes o erguidos, raíz engrosada (Kiesling, 2018), pivotante gruesa y reservante (Méndez, 2013); espina central generalmente 1(-4), de 2-4 cm long, y espinas radiales 6-12, de 0,5-2 cm de long, algunas grisáceas (Kiesling, 2005; Trevisson y Demaio, 2006; Trevisson y Perea, 2009). Flor blanca de 15-22 cm long (Kiesling, 2018), en forma de embudo, pericarpelo y receptáculo floral verdosos, lisos, con algunas escamas poco evidentes, tépalos externos de 9,5 x 1,5 cm, mucronados, rosados o rosado-oscuros; tépalos internos más cortos y anchos que los externos, de 7 x 2 cm; filamentos blancos y anteras amarillas; estilo y estigma amarillentos, 11 lóbulos estigmáticos; las flores se originan en las areólas jóvenes; son de antesis nocturna (Trevisson y Demaio, 2006; Trevisson y Perea, 2009); sin perfume (Ocho et al., 2010). Fruto oval a elíptico, de + 6 cm long x 2,5 cm diámetro, verde o castaño-ro-

jizo (Kiesling, 2018), o morado-parduzco a rojo-pálido, con dehiscencia longitudinal (Trevisson y Demaio, 2006; Trevisson y Perea, 2009). Pulpa morada (Trevisson y Demaio, 2006). Semilla negra, de 2,5 mm long, textura levemente verrucosa; región hilo-micropilar grande y deprimida (Kiesling, 2005).

Un estudio realizado en la provincia Argentina de Mendoza en relación a las heladas y plantas nodrizas, indica que *C. aethiops* alcanza mayor altura (3,40 m) bajo *Acacia furcatispina*, con un promedio 2,65 m; y con *Larrea cuneifolia* alcanza menos (0,89 m), con promedio de 1,11 m; raramente crece bajo otros arbustos; llega bajo estas nodrizas generalmente por medio de aves; lo que indicaría que su altura y volumen están regulados por las heladas, pero a su vez dependen de la presencia y altura de sus plantas nodrizas (Méndez, 2013).

De acuerdo con Kiesling (2005) los tallos se presentan normalmente jóvenes, ya que la parte aérea de la planta muere después de 2-3 años; aquellos brotan nuevamente de las raíces o de tallos basales enterrados por lo que su comportamiento es de una geófito con ciclos de dos a tres años.

Las raíces pueden emitir yemas y brotes a ras del suelo, aún si está afectada por el fuego (Méndez, 2013).

En la Argentina, se distribuye en la provincia fitogeográfica del Monte, entre 0-800 msnm (Kiesling, 2018) y se encuentra en las Ecorregiones “Chaco Seco”, “Espinal”, “Monte de llanuras y Mesetas” de acuerdo a la interpretación de los mapas de Trevisson y Demaio (2006) y Trevisson y Perea (2009), quienes mencionan que alcanza incluso los 1500 msnm.

Habita sitios planos o de suaves pendientes; crece sobre suelos “suelos, arenosos o algo pedregosos” (Trevisson y Perea, 2009), o bien en suelos poco profundos, debajo de árboles y arbustos (Trevisson y Demaio, 2006) y en salitrales (Pérez Cuadra, 2008).

Florece a principios de noviembre hasta enero. Fructifica entre abril y junio (Trevisson y Demaio, 2006; Trevisson y Perea, 2009).

El epíteto *aethiops* viene de Etiopía, haciendo alusión al color negro azabache de sus espinas. En la Argentina se lo conoce como “hachón” (Ochoa et al., 2010) y es una de las cactáceas columnares más notables (Mamani et al., 2017).

Cereus aethiops figura entre las 1200 especies de la Enciclopedia Ilustrada de los Cactus (Innes y Glass, 2001) y entre las 300 especies de Guías de la Naturaleza: Cactus (Pizzetti, 2003) donde se destacan aspectos de su cultivo. En Argentina tiene gran valor de uso por pobladores locales (Mamani et al., 2017). También es aprovechada por la tortuga Chaqueña *Chelonoidis chilensis* (Zacarías et al., 2016). Por otro lado, se menciona su uso ornamental para lugares pequeños, admite cultivo en macetas (Ochoa et al., 2010).

El sitio de estudio corresponde al Departamento de Boquerón, NW de la Región Occidental del país, y forma parte del denominado “Chaco seco”. Pertenece a la “Ecorregión Chaco (NT0210)” de acuerdo a la “Evaluación Ecorregional del Gran Chaco Americano” realizada en 2005 por países de la región. En Paraguay, esta ecorregión se caracteriza por una temperatura media de 26° C y precipitaciones anuales entre 600 mm (o menos) y 900 mm. Incluye varios tipos de hábitats, predominando los bosques espinosos, la sabana y áreas de transición entre éstas. (Bartrina, 2007). La formación vegetal típica corresponde a los “Bosques xeromorfo” que pueden llegar a un máximo de 12 m; crecen sobre muy duros y estructurados, arcillosos (Mereles, 2007). Aparte de los datos ecológicos mencionados para Argentina, no se encontró información de otros países donde crece.

Los objetivos del estudio fueron: 1) confirmar la presencia de *Cereus aethiops* en Paraguay, indicando la ubicación de los individuos; 2) observar y registrar las características morfológicas de esta especie, para compararlas con *C. forbe-*

sii Otto ex C. F. Först. y *Monvillea spegazzinii* (F.A.C. Weber) Britton y Rose, dado que se maneja la hipótesis de que *C. aethiops* sea un híbrido, y aquellos sus posibles progenitores.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se enmarca en la actualización de un material ilustrado sobre cactáceas de Paraguay, iniciado hace unos años por la bióloga e investigadora de Cactáceas, Ana Pin y colaboradores. Este equipo no tenía referencias sobre la presencia de *C. aethiops* en Paraguay hasta fines del 2020, en que se conversó con Verena Friesen en uno de los viajes. Friesen había observado a este taxón en varios sitios del Departamento de Boquerón, en diferentes años, y colectó un ejemplar (2017) para su cultivo en el patio del Museo Menno Simons, de la colonia Fernheim (Filadelfia). Posteriormente se herborizó este material en flor y se depositó en el herbario de dicho museo. Considerando los recursos financieros, logísticos y de tiempo disponibles, Pin eligió uno de los sitios mencionados por Friesen para ampliar los registros y poder publicar la información sobre la presencia de *C. aethiops* en Paraguay.

Revisión de materiales de *Cereus*

Para conocer la diversidad y distribución de especies de este género en nuestro país, entre el 2010 y 2021 se revisaron materiales en los herbarios nacionales de la Facultad de Ciencias Químicas/ UNA (FCQ); de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales FACEN/UNA; del Museo Nacional de Historia Natural del Paraguay (PY); de la Sociedad Científica del Paraguay (SCPY); y del Museo Menno Simons de la Colonia Fernheim (Filadelfia).

Fueron revisados también los herbarios SI, del Instituto de Botánica Darwinion (IBODA); CTES, del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE); y BM, del Museo Británico de Londres, Inglaterra.

Material estudiado (en herbario): PARAGUAY. Boquerón: “Colonia Neuland, 30 Km al SW”, 22°48.172' S y 60°17.346' W, 12.01.2021, *Pin, A. 933* y *Rodríguez, L. 268* (FCQ); Filadelfia, cultivada en Patio Menno Simons (con observación de V. Friesen: “origen Magariño, zona Pilcomayo, Dpto. Boquerón”), 20.11.2017*, *Berger, L. 153* (Herbario Col. Fernheim).

Revisión de bases de datos electrónicas de herbarios del extranjero

Con el fin de conocer la existencia de posibles colectas de *C. aethiops* de Paraguay depositadas fuera del país, en el 2020 se revisaron las bases de datos *on line* de los siguientes herbarios: del Museo Botánico de Berlín-Dhalem, Berlín, Alemania (B); del Conservatorio y Jardín Botánicos de Ginebra, Suiza (G); del Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido (K); de la Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU); del Missouri Botanical Garden, USA (MO); del Museo Nacional de Historia Natural de Francia, París, Francia (MNHN – París); de Nueva York (NYBG); del Museo Sueco de Historia Natural, Estocolmo, Suecia (S); y del Instituto de Botánica de la Universidad de Viena, Austria (WU).

Elaboración de mapa

Para visualizar la distribución de la especie en nuestro país, fue confeccionado un mapa utilizando el software QGIS 3.26.2, mediante la cartografía base utilizando capas vectoriales de los límites Políticos, localización de ciudades e hidrografía provenientes del Censo Nacional del 2012 (DGEEC, 2012). Esta información fue complementada con las ecorregiones extraídas del “Mapa de Ecorregiones de Paraguay en la Cuenca del Plata” (MADES, 2014) y la precipitación media anual (REDIEX, 2009). Fueron utilizadas las coordenadas geográficas que aparecen en las Tabla 1 para localizar los puntos de distribución en el mapa (Figura 1).

TABLA 1. Localizaciones de *Cereus aethiops* Haw. (Cactaceae), en Paraguay

Registro	Latitud	Longitud	Sitio	Observaciones
1 y 2	22°48.172' S	60°17.346' W	“Colonia Neuland, 30 Km al SW” (Res. Pozo Monte)	Material de referencia: Pin, A. N° 933 (FCQ), L. Rodríguez, T. Ríos & K. Waldbrunner
3 y 4	23°16'58.7"S	61°07'31.8"W	Línea 142, zona Magariño (área del Pilcomayo).	Rodríguez, L. N° 268 (FCQ), A. Pin, T. Ríos & K. Waldbrunner. Material de referencia: Bergen, L. N° 153 (Herbario Col. Fernheim)
5	22°03'51.8"S	61°37'36.8"W	Picada 500, camino acceso a Estancia Don Juan	Observado en campo. Sin material de referencia
6	21°12'33.8"S	61°39'23.5"W	Parque Nacional Tte. Enciso	Observado en campo. Sin material de referencia
7	22°37'47.5"S	61°18'26.7"W	Borde de camino en el monte, Línea 11, Zona Cabezón	Observado en campo. Sin material de referencia
8	22°26'49.3"S	62°15'29.7"W	Zona Pedro. P. Peña, Comunidad indígena San Agustín, barrio María Auxiliadora	Observado en campo. Sin material de referencia

Los puntos N° 1 y 2 corresponden a colectas diferentes del mismo individuo, en el mismo tiempo y lugar, por lo que las coordenadas son las mismas; los puntos 3 y 4 corresponden al mismo individuo que fue observado y colectado para cultivo por V. Friesen, y posteriormente herborizado en estado fértil por L. Bergen

Trabajo de campo

Para obtener una muestra botánica y registros del sitio donde crece el *C. aethiops*, en el 2021 se realizó 1 viaje al Departamento de Boquerón, en las cercanías de la Colonia Neuland (Reserva privada Pozo Monte) donde se encontraba uno de los ejemplares con referencias precisas. Antes del 2021, V. Friesen había realizado exploraciones esporádicas en los Departamentos de Alto Paraguay y Presidente Hayes sin éxito en la localización de esta especie.

Descripción del material

Se realizó en base a las colectas botánicas y a fotografías de las autoras. Se registró el proceso de antesis de cuatro flores, que abrieron posteriormente a la colecta, fuera de su hábitat natural.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cereus aethiops Haw., Philos. Mag. Ann. Chem., 7: 109-110. 1830.

Sinónimos

Cereus aethiops Haw. var. *landbeckii* (Phil.) Backeb., *Cereus landbeckii* Phil., *Cereus aethiops* Haw. var. *melanacanthus* (K. Schum.) Backeb., *Cereus coerulescens* Salm-Dyck var. *melacanthus* K. Schum., *Cereus coerulescens* Salm-Dyck, *Cereus azureus* J. Parm. ex Pfeiff., *Cereus chalibaeus* Salm-Dyck, *Cereus coerulescens* Salm-Dyck var. *landbeckii* (Phil.) K. Schum., *Piptanthocereus aethiops* (Haw.) F. Ritter, nom. illeg.

Nombre común

“ucle chico”. Se denomina “ucle” a *C. forbesii* Otto ex C. F. Först (Friesen, 2004). Los pobladores de la zona del Pilcomayo identifican a *C. aethiops* como una forma más pequeña del primero.

Distribución de *C. aethiops* en Paraguay

La distribución de *C. aethiops* abarca el Departamento de Boquerón (Figura 1).

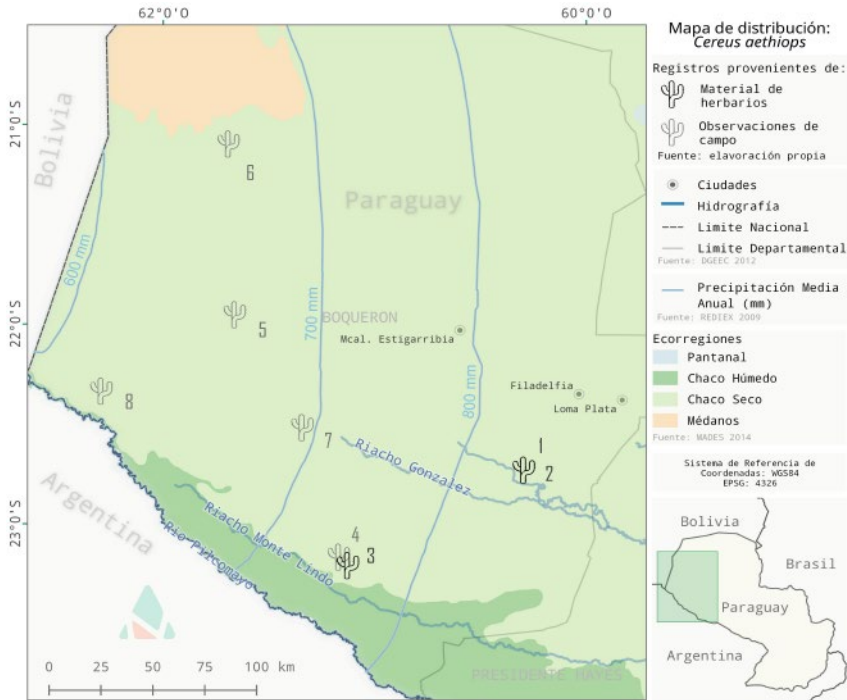


Figura1. Mapa de distribución de *Cereus aethiops* Haw. en Paraguay. Fuente: elaboración de Ayala, A.

El mapa de distribución preliminar de *C. aethiops* nos indica que se trata -hasta el momento- de una especie propia del Chaco seco. No ha sido observada en los Departamentos de Alto Paraguay y Presidente Hayes, lo que no descarta su presencia en estos sitios. De acuerdo con uno de los puntos de observación -el Parque Nacional Teniente Enciso- se encuentra al menos en un Area Silvestre Protegida.

A pesar de su amplio rango de distribución en la Argentina (Mamani, 2019) no se lo menciona para las provincias de Chaco ni Formosa, cercanas a Paraguay.

Descripción botánica

De acuerdo a los ejemplares estudiados, se describe a *Cereus aethiops* subrayando las particularidades encontradas en relación a la literatura consultada: arbusto o arbolito más -o menos- ramificado; de (1) 3 (-7) m altura; tallos cilíndricos; en individuos muy desarrollados y cercanos al

suelo: tallo basal de hasta 15 cm diámetro, esclerosados, grises, parcialmente sin espinas (Figura 2.A); luego poco o muy ramificado; ramas de 3.5-4 cm diámetro, verde-grisáceas o verde-azuladas (glaucas), leve aspecto manchado. Costillas bien definidas, 5-6, poco profundas (1 cm). Espinas 3-4 (-7); en ramas nuevas: 2 laterales y 1(-3) basales, cortas, negras; en ramas antiguas: mayor cantidad, largas y grises, aparece espina central (1 o más) de mayor longitud, dirigida hacia arriba; algunas son grises de punta negra. Botones: hasta 9 cm longitud antes de anthesis (Figura 2 B y 2.C). Flores infundibuliformes de 11-12 cm longitud x 10 cm diámetro (en anthesis completa); tubo floral glabro, verde-grisáceo con escamas escasas, diminutas, castañas; tépalos externos lanceolados, verdosos con tonalidades moradas en el extremo; tépalos internos lanceolados, más anchos en los externos, blancos a levemente rosados, fuertemente mucronados; filamentos adheridos al interior del tubo floral, luego se disponen

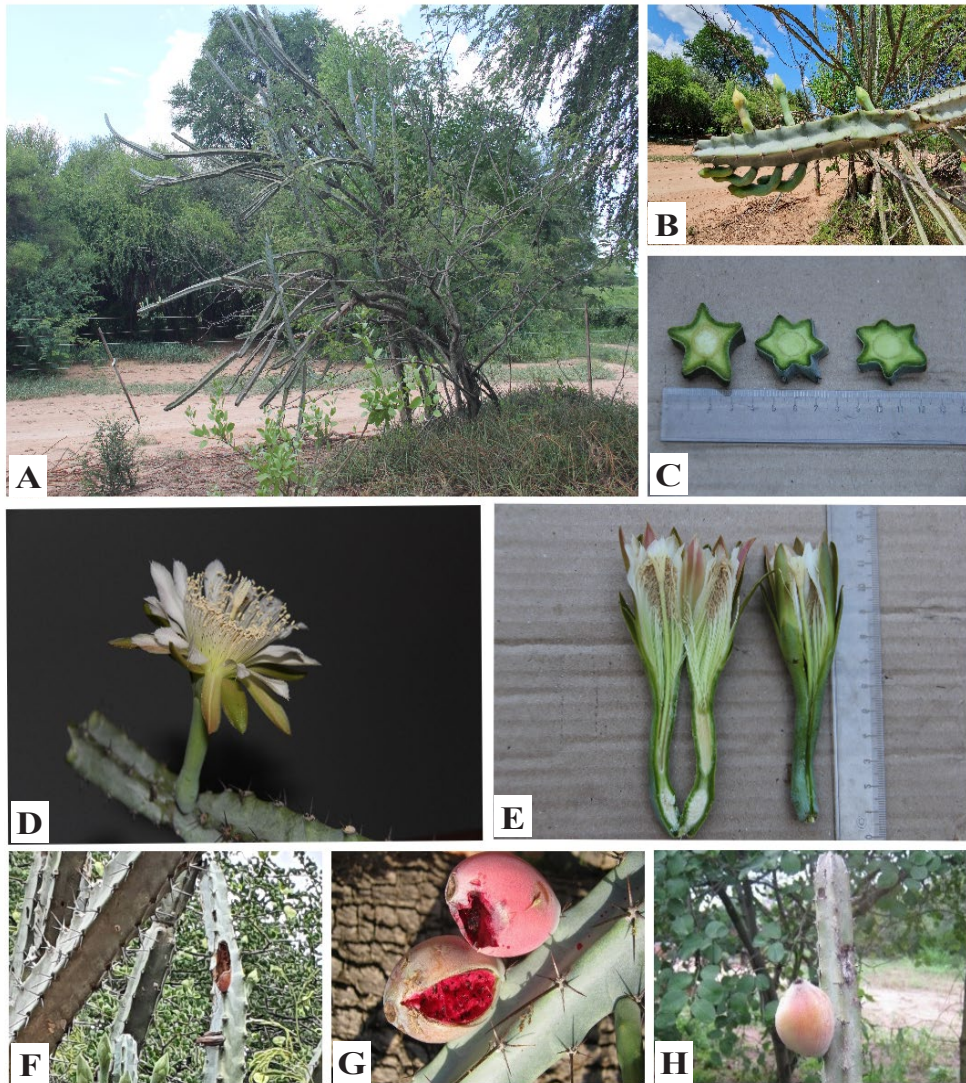


Figura 2. A) *C. aethiops* Haw. en su hábitat, creciendo al pie de *Senegalia praecox* (Griseb.) Seigler & Ebinger. Foto: A. Pin, 2021. B) Botones florales en rama terminal de *C. aethiops* Haw. Foto: L. Rodríguez, 2021. C) Corte de tallo de *C. aethiops* Haw. con 5-6 costillas. Foto: Pin, 2021. D) Flor nocturna de *C. aethiops* Haw., antesis. Foto: A. Pin, 2021. E) Corte longitudinal de flor de *C. aethiops* Haw. incluyendo ovario. Foto: A. Pin, 2021. F) Fruto maduro de *C. aethiops* Haw. consumido por aves; botones florales. Foto: L. Rodríguez, 2021. G) Frutos maduros de *C. aethiops* Haw. con apertura longitudinal con rastros de picoteo. Foto: V. Friesen, 2013. H) Fruto maduro y cerrado de *C. aethiops* Haw. Foto: V. Friesen, 2011

libres en forma escalonada hasta el final de la corola, blanco-verdosos; anteras blanquecinas; estilo verdoso, blanquecino o levemente rosado; estigma con 13-14 lóbulos digitiformes, blanco o levemente rosado, sobresale 0,7 cm de la corola

(Figura 2.D y 2.E). Flor de aroma suave: en el interior de la corola se percibe aroma a flor de *Cereus* y en la parte externa del tubo floral huele a *Monvillea* (más dulzón, intenso y agradable); se percibe hasta a 1 m de distancia (o más) dis-

persado por el viento. Fruto ovoide, glabro, con ombligo pequeño; pericarpio rosado, morado a verdoso-morado; apertura longitudinal; pulpa morada; semillas negras (Figura 2.F, 2G, y 2.H).

De acuerdo a Haworth (Taylor y Phillips, 1830) y a Britton y Rose (1920), *C. aethiops* tiene porte arbustivo. Sin embargo, se registró un ejemplar de casi 4 m altura; de porte arbóreo, coincidiendo con Trevisson y Perea (2009: Anexo, foto A2); muy ramificado, como mencionan Britton & Rose (1920), y con tallo basal único.

La altura del ejemplar registrado podría deberse a su asociación con *Senegalia praecox* (Griseb.) Seigler & Ebinger como planta “nodriza”, tal como lo expuso Méndez (2013) con *Acacia furcatispina* Burkart (= *Senegalia gilliesii* (Steud.) Seigler & Ebinger).

En los primeros años de crecimiento, *C. aethiops* es de hábito arbustivo (erguido, pocas ramas); con el tiempo adquiere mayor tamaño y aspecto “arborescente” (con tronco basal, más ramificado). Con mayores dimensiones, tiende a doblarse, incluso a quebrarse por el peso de sus frutos. Si encuentra apoyo puede llegar a los 7 m de altura, como el que fue cultivado por Friesen cerca de un árbol que le sirve de soporte.

Las características botánicas de los ejemplares estudiados coinciden en su mayor parte con las mencionadas en la literatura. Por el contrario, se presentaron las siguientes diferencias: costillas y espinas en menor cantidad, areolas con diferente coloración, flores de menores proporciones, lóbulos estigmáticos en cantidad levemente mayor, y la presencia de aroma.

La longitud de la flor parece presentar gran variación: desde los 11 cm como se registró en este trabajo hasta los 15, 18 y 22 cm mencionada por otros autores (Britton y Rose, 1920; Ochoa et al., 2010; Kiesling, 2018). El tamaño de la corola parece ser más estable: 12 cm (Britton y Rose, 1920; Ochoa et al., 2010; Kiesling, 2018) y 10 cm como en el presente estudio, aunque es un carácter más difícil de registrar por su antesis nocturna.

El color de la pulpa (morada) del ejemplar estudiado coincide con lo mencionado por Trevisson y Demaio (2006). La descripción de este carácter en la bibliografía revisada es escasa. De acuerdo con una de las fotografías de Trevisson y Perea (2009) el fruto presenta pulpa blanca, lo que parece ser un error, por lo que se infiere que el fruto pertenece a otra especie de *Cereus*.

Fenología

De acuerdo con los registros botánicos y fotográficos, *C. aethiops* florece en Paraguay entre noviembre y enero, y fructifica entre enero y marzo. La floración y fructificación se dan antes que lo indicado para el territorio argentino (Trevisson y Perea, 2009; Trevisson y Demaio, 2006).

La antesis inicia aproximadamente a las 22:00 h; la cabeza del botón floral se presenta hinchada, globosa (sin aroma aún). A las 23:00 h el extremo se abre 5%; entre las 0:30 y 1:30 del día siguiente, abre del 30-50 %, con aroma suave. A las 4:00 h se encuentra 100% abierta. Entre las 5:00 y 5:30 h la corola se halla 100% abierta pero los lóbulos estigmáticos ya están cerrando. A las 8:15 h, la flor sigue abierta (80%) (Figura 3).

Para esta especie se han mencionado flores diurnas y sin perfume (Ochoa et al., 2010); sin embargo la antesis diurna no es propia del género *Cereus*. Por otro lado, en el ejemplar colectado en campo y luego cultivado, se ha percibido la presencia de aromas.

Por todo lo mencionado previamente proponemos que: *C. aethiops* podría ser un híbrido entre *C. forbesii* Otto ex C. F. Först. y *Monvillea spegazzinii* (F.A.C. Weber) Britton & Rose, basados en los siguientes motivos: en las cercanías de estos individuos se ha observado siempre la presencia de *C. forbesii* y *M. spegazzinii*, o al menos una de éstas. Los individuos de *C. aethiops* siempre están solitarios, con distancias muy grandes entre uno y otro; se observan raramente en el campo. Esto hace suponer que su dispersión no es por medio de las aves (aunque consuman

su fruto), dado que las mismas no podrían desplazarse a distancias muy lejanas. El aspecto de los tallos jóvenes es similar al de *M. spegazzinii*, en cuanto al aspecto, color, espinas y presencia de manchas (Figura 4. A y B), sin embargo la presencia de costillas bien marcadas, su grosor y diámetro circular se asemejan a *C. forbesii*. Las espinas son relativamente cortas, pero no dobladas o pegadas al tronco (retrorsas) como en *M. spegazzinii*. Aunque algunos individuos de *C. aethiops* desarrollen un tronco definido –aunque corto– su porte predominante es apoyante, como en *Monvillea*. Entre los ejemplares estudiados (colectados y observados) se notó diferencia de coloración en la corola: un individuo con tépalos blanco-verdosos y otros con tonalidades rosadas; de acuerdo a Friesen, esta variación de color se observa en *C. forbesii*, en cuyo hábitat natural puede presentar flores de casi blancas hasta rosadas, o casi rojas (Figura 4. C, D, E, F y G). El

color de la pulpa del fruto (morado) es similar al de *C. forbesii* y al de *M. spegazzinii* (Figura 4. H, I y J), carácter que se mantiene constante en las poblaciones de las tres especies, de acuerdo a las observaciones de Friesen. Mamani (2019, 35) menciona en su tesis sobre *Cereus* de la Argentina que *C. aethiops* tiene rasgos comunes a *Cereus spegazzinii* F.A.C.Weber (= *M. spegazzinii*). Por otro lado, el nombre de “ucle chico” usado localmente para esta especie (zona Pilcomayo), también se la dan a *M. spegazzinii*, dado su parecido.

Hábitat

Crece en el bosque chaqueño de 4-5 m altura, a los 141 msnm, en vegetación xerófila; suelo arcilloso, marrón claro. En las cercanías (50 m) hay un paleocauce de recarga temporal. En el sitio ingresa ganado ocasionalmente.

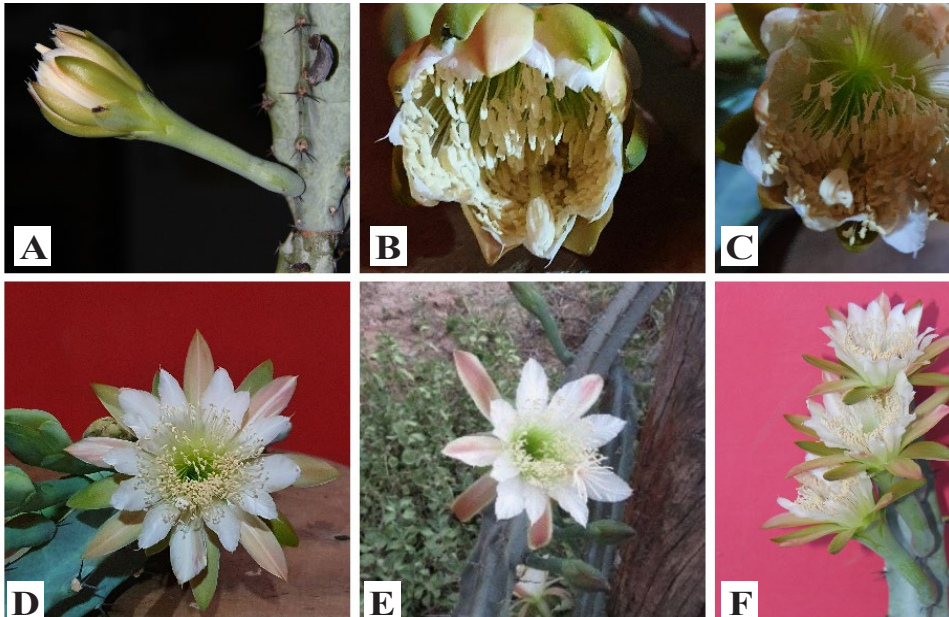


Figura 3. A) Proceso de antesis de *C. aethiops* Haw. A las 22 hrs, el botón inicia apertura formando una cabeza globosa. Foto: A. Pin, 2021. B) A las 00:37 h, la flor muestra estructuras internas; éstas se van desplegando. Foto: L. Rodríguez, 2021. C) A las 01:12 h, el estigma empieza a separar sus lóbulos digitiformes. Foto: L. Rodríguez, 2021. D) A las 04:30 h, la flor está 100% abierta. Foto: L. Rodríguez, 2021. E) A las 7:00 h está 100% abierta. Foto: V. Friesen, 2013. F) A las 8:15 h (día siguiente) está nuevamente 80% abierta (proceso de cierre). Foto: A. Pin, 2021

Especies asociadas

Entre las especies acompañantes se destacan: *Gonopterodendron sarmientoi* (palo santo), *Ceiba speciosa* (samu'u), *Aspidosperma quebracho-blanco* (quebracho blanco), *S. praecox* (jukery hu), *Anisocapparis speciosa* (Griseb.) (pajagua naranja) y *Capparicordis tweediana* (sacha membrillo), *Deinacanthon urbanianum* (caraguata), *Megathyrsus maximus* (pasto Guinea) y cactáceas: *Cereus forbesii*, *Harrisia* sp. y *Monvillea spegazzinii*. El ejemplar colectado de *C. aethiops* crecía apoyado sobre *S. praecox*.

Usos

Los pobladores locales consumen el fruto fresco cuando lo encuentran; lo asocian al de *C. forbesii* o *M. spegazzinii*, considerando su parecido.

CONCLUSIONES

Cereus aethiops, crece en Paraguay en el Departamento de Boquerón. Es propio del ecosistema chaqueño seco. No se descarta su presencia

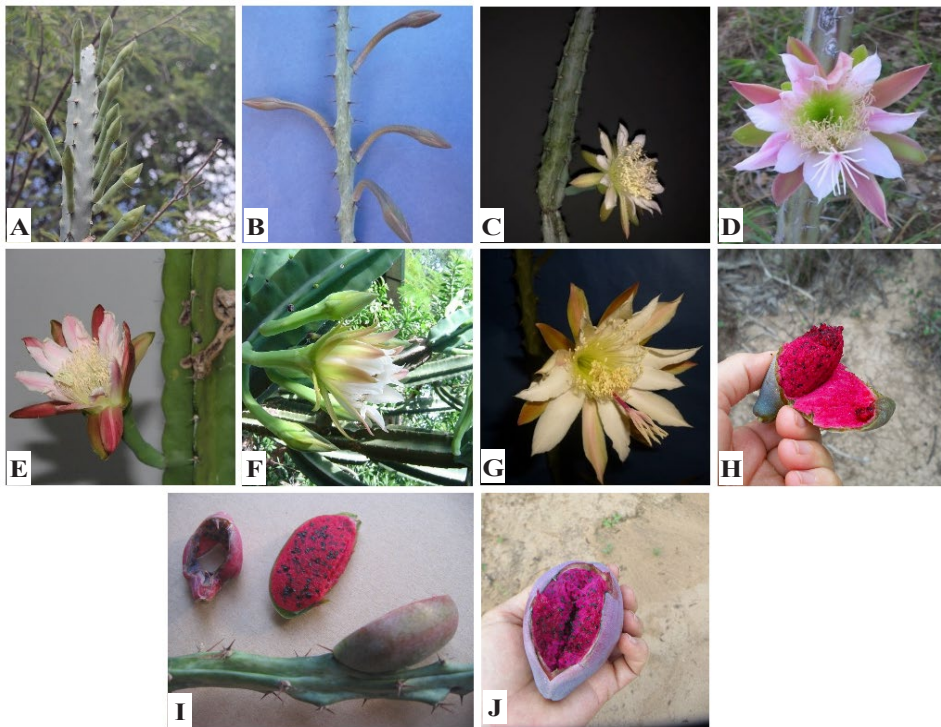


Figura 4. **A)** *Cereus aethiops* Haw. con tallos robustos, erguidos, verde-azulados. Foto: A. Pin, 2021 (en campo). **B)** *Monvillea spegazzinii* (F.A.C. Weber) Britton & Rose con tallos más delgados, erguidos o apoyantes, verde-azulados. Foto: A. Pin, 2012 (en cultivo). **C)** *C. aethiops* Haw. con flores blanco-verdosas. Foto: A. Pin, 2021. **D)** *C. aethiops* Haw. con flores levemente rosadas. Foto: V. Friesen, 2010. **E)** *C. forbesii* Otto ex C. F. Först. con flores de tonalidad rosada (Ñeembucu). Foto: A. Pin, 2020. **F)** *C. forbesii* Otto ex C. F. Först. con flores de tonalidad más blanquecinas (Chaco). Foto: V. Friesen, 2003. **G)** *M. spegazzinii* (F.A.C. Weber) Britton & Rose, con flores blancas y tépalos externos rosado-verdosos. Foto: A. Pin, 2013. **H)** Fruto de *C. aethiops* Haw. (zona Cabezón). Foto: V. Friesen, 2010. **I)** Fruto de *M. spegazzinii* (F.A.C. Weber) Britton & Rose (AP730B). Foto: A. Pin, 2010. **J)** Fruto de *C. forbesii* Otto ex C. F. Först. Foto: V. Friesen, 2016

en otros puntos del Chaco o de la Región Oriental con el mismo tipo de hábitat. La posibilidad de que esta especie sea un híbrido no está confirmada, pero parece tener sentido al encontrar varios caracteres comunes con *C. forbesii* y *M. spegazzinii*. Para comprobarlo, se requieren nuevas investigaciones que puedan explicar su real identidad. Se deberían considerar estudios morfológicos, moleculares y fitoquímicos, así como fenológicos, de abundancia, suelo, clima y ecológicos en general, comparándolos con datos en países limítrofes.

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Atahualpa Ayala, por la elaboración del mapa de distribución. Al Ing. Tomás Ríos, del Museo Nacional de Historia Natural del Paraguay / MADES, por acompañar los trabajos de campo y por su apoyo personal a los objetivos del estudio. A la Sra. Käthe Waldbrunner (Reserva privada Pozo Monte) por permitirnos el ingreso a su propiedad y apoyar el trabajo de campo. A la Prof. Liliane Bergen, responsable del Herbario de la Colonia Fernheim, quien nos atendió muy amablemente durante nuestra visita.

APORTES DE LOS AUTORES

Todos los autores han contribuido al trabajo de campo y gabinete. El aporte de información de VF fue clave para decidir rastrear en su hábitat a la especie estudiada. En conjunto se organizó el trabajo de campo. La revisión de material botánico fue realizada por AP y LR en los herbarios mencionados en el trabajo; así como la observación nocturna de ejemplares colectados en campo. La redacción general estuvo a cargo de AP, y la revisión y ajustes del del trabajo estuvo a cargo de VF y LR. Todas las autoras aportaron fotografías.

CONFLICTO DE INTERESES

No existen conflictos de interés entre los autores. Se ha firmado una carta de consentimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, E. F. (2001). The Cactus Family. Timber Press.
- Bartrina, L. (2007). Contexto geográfico general. En: D. Salas-Dueñas y J.F. Facetti (eds.). Biodiversidad del Paraguay. Fundación Moisés Bertoni (1° ed., pp. 25-46).
- Britton, N. L. y Rose, J. N. (1920). The Cactaceae. Descriptions and illustrations of plants of the Cactus Family. (Vol. II: Cereus). The Carnegie Institution of Washington.
- DGEEC. (2016). Atlas Cartográfico del Paraguay, 2012. Dirección General de Estadística, Encuestas y Censos (Departamento de Boquerón, pp.537).<https://www.ine.gov.py/Publicaciones/Biblioteca/atlas-cartografico/Atlas%20Cartografico%20del%20Paraguay,%202012.pdf>
- Friesen, V. (2004). Urunde'y schlorrekaktus pehen: Una guía para plantas leñosas del Chaco. Iniciativa para la Investigación y Transferencia de Tecnología Agraria (INTTAS). Loma Plata.
- Haworth, A. H. (1830). Decas duodecima Novarum Plantarum Succulentarum. En R. Taylor & R. Phillips. The Philosophical Magazine and *Annals of Philosophy*. University of London, 7(39), XV:09–110. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/53110#page/130/mode/1up>
- Hunt, D. (1999). CITES Cactaceae Check List. Royal Botanic Gardens Kew & International Organization for Succulent Plant Study (IOS). (2a ed.).
- Hunt, D. (2016). Cactaceae Checklist. CITES. Royal Botanic Gardens Kew & International Organization for Succulent Plant Study. (3°

- ed., pp. 175).
- Innes, C. y Glass, C. (2001). The Illustrated Encyclopedia or Cacti. Quantum Publishing.
- Kiesling, R. (1990). Cactus de la Patagonia. Edición del autor de la Flora Patagónica - Parte V: Dicotiledóneas dialipétalas (Oxalidaceae a Cornaceae). Argentina.
- Kiesling, R. (2005). Cactaceae. En: N. Bacigalupo (ed.). Flora ilustrada de Entre Ríos (Argentina). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (Parte IV, Vol.4, pp. 401-444).
- Kiesling, R. y Ferrari, O. (2005). 100 Cactus argentinos. Editorial Albatros.
- Kiesling, R. y Demaio, P. (2018). 100 Cactus argentinos. Editorial Albatros.
- Lodé, J. (2015). Taxonomía de las Cactáceas. Cactus Aventures International.
- MADES. (2014). Mapa de Ecorregiones del Paraguay. Ministerio del Ambiente y Desarrollo Sostenible. http://www.mades.gov.py/wp-content/uploads/2018/07/04_Mapa-de-Ecorregiones-1024x725.jpg
- Mamani, C., Sosa, C., Cormenzana Mendez, A., González, M. y Ortega Baez, P. (2017). Distribución geográfica potencial de *Cereus aethiops* y *C. hankeanus* (Cactaceae) en Argentina. XXXVI Jornadas Argentinas de Botánica, Mendoza, Argentina. https://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=33713&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=7162348
- Mamani, C. (2019). El género *Cereus* Mill. (Cereaceae, Cactaceae) en Argentina: diversidad taxonómica, distribución geográfica y estado poblacional. [Tesis doctoral, Universidad Nacional del Nordeste]. https://repositorio.unne.edu.ar/bitstream/handle/123456789/27855/RIUNNE_FACENA_TD_Maman%20C3%AD_CM.pdf?sequence=1
- Méndez, E. (2013). Repuestas de *Cereus aethiops* (Cactaceae) frente a las heladas en el W árido de Mendoza-Argentina. Efecto protector de las alturas de plantas nodrizas. *Bol. Soc. Latin. Carib. Cact. Suc.* 10 (2): 20-24 mayo-agosto.
- Mereles, F. (2007). La diversidad vegetal en el Paraguay. En: D. Salas-Dueñas y J.F. Facetti (eds.). Biodiversidad del Paraguay. Fundación Moisés Bertoni (1° ed., pp. 89-105).
- Ochoa, J., Corvalán, D. y Nazareno, M. (2010). Cactáceas de Santiago del Estero. Universidad Nacional de Santiago del Estero.
- Pérez Cuadra, V. (2008). Salitral de la Vidriera, un refugio para especies vegetales con características particulares. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas.* (Vol. 5, N° 3, pp. 6-9). http://www.ibiologia.unam.mx/slccs/www/pdf/Boletin/Vol_5_No_3_Sep-Dic_2008.pdf
- Pin, A. y Simon, J. (2004). Guía Ilustrada de los Cactus del Paraguay. SEAM/PNUD-GEF y Universidad de Barcelona/Grupo GREB.
- Pizzetti, M. (2003). Guías de la naturaleza: Cactus. Grijalbo (3° ed., pp. 333).
- The PlantList, a working list of all plant species. *Cereus.* (s.f). <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Cactaceae/Cereus/>
- REDIEX. (2009). Atlas geográfico del Chaco paraguayo. Informe y 12 mapas temáticos. Red de Inversiones y Exportaciones (Mapa de precipitaciones, pp.22-23). <https://docplayer.es/15120597-Informe-y-12-mapas-tematicos-unidad-gis-rediex-mayo-de-2009-asuncion-paraguay.html>
- Trevisson, M. y Demaio, P. (2006). Cactus de Córdoba y el centro de Argentina. L.O.L.A. (1° ed.).
- Trevisson, M. y Perea, M. (2009). Cactus del oeste de Argentina. L.O.L.A. (1° ed.).
- Tropicos. (s.f.). *Cereus aethiops* Haw. Missouri Botanical Garden. <https://www.tropicos.org/name/5102916>
- Taylor, R. & Phillips, R. (1830). *The Philosophical magazine and Annals of Philosophy*, 7(39): 109-110. London, England. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/53110#page/130/mode/1up>
- Zacarías, G., Díaz Gómez, J. M. y de la Fuente,

M. (2016). Biología, Ecología, Paleontología y Filogenia de nuestra tortuga Chaqueña (*Chelonoidis chilensis*) Pequeño pariente de las tortugas terrestres gigantes de las Islas Galápagos. CONICET. 6(1):8-21. https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/62109/CONICET_Digital_Nro.eccd2719-93df-4617-9061-399648f2a97e_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Zuloaga, F. O.; Belgrano, M. J. y Zanotti, C.A. (2019). Actualización del Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. *Darwiniana, nueva serie* 7(2): 208-278. <https://doi.org/10.14522/darwiniana.2019.72.861>

Detección *in silico* de fitomoléculas con potenciales actividades inhibitorias de Nucleolinas (NCL)

Gimenez Vera, S.^{1*} ; Gayozo, E.¹ ; Marín, L.¹ 

¹ Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, San Lorenzo, Paraguay

* E-mail del autor: sebastiangimenezvera@gmail.com

Detección *in silico* de fitomoléculas con potenciales actividades inhibitorias de Nucleolinas (NCL). Las nucleolinas son proteínas localizadas generalmente en el núcleo celular, citoplasma y la superficie de las membranas cumpliendo funciones imprescindibles para la fisiología celular. Sin embargo, su mal funcionamiento se encuentra íntimamente relacionado con muchos tipos de cáncer, por lo que pueden ser consideradas como proteínas dianas para la búsqueda de moléculas con potencial inhibitorio con la finalidad de desarrollar nuevas estrategias para combatir al cáncer. Esta investigación tuvo como objetivos detectar fitoconstituyentes que presenten afinidades de interacción por el dominio de unión al ARN (DUA) de las nucleolinas y caracterizar dichas interacciones proteína-ligando mediante el análisis del acoplamiento molecular. Se preseleccionaron quince fitomoléculas con diferentes actividades biológicas para su estudio y se determinó el índice de drogabilidad del dominio DUA de las nucleolinas, las cuales presentaron un valor de 0,80 siendo altamente drogable. Posteriormente, se realizaron las pruebas de acoplamiento molecular entre los fitoconstituyentes seleccionados y la nucleolina. Los datos obtenidos en los ensayos de acoplamiento molecular evidenciaron que los fitoconstituyentes que presentaron mayor afinidad de interacción *in silico* fueron los triterpenos Maytenina, Taraxerol, Cucurbitacina B y Pristimerina, los cuales demostraron valores de energías libre de interacción (ΔG) iguales a $-10,80 \pm 0,03$ kcal.mol⁻¹, $-10,58 \pm 0,14$ kcal.mol⁻¹, $-9,58 \pm 0,12$ kcal.mol⁻¹ y $-9,48 \pm 0,35$ kcal.mol⁻¹ respectivamente. Los residuos involucrados activamente en las interacciones con las biomoléculas estabilizando la formación de la estructura de los complejos proteína-ligando fueron Asn100, Tyr103, Tyr134 y Arg158. Los hallazgos sugieren que dichos triterpenos podrían actuar como potenciales inhibidores de las nucleolinas debido a las afinidades manifestadas, sin embargo, estos resultados necesitan ser confirmados mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Palabras clave: Acoplamiento molecular, fitomoléculas, inhibidores, nucleolina

***In silico* detection of phytomolecules with potential inhibitory activities of Nucleolins (NCL).** Nucleolins are proteins found in the cell's nucleus, cytoplasm, and on membrane surfaces, performing critical functions for in the cell's physiology. It's malfunction is linked to various types of cancer, and thus are considered as target proteins in the search for molecules with potential anticancer effects. This research aims to detect phytoconstituents that show interaction affinities for the RNA-binding domain (RBD) of nucleolins and to characterize said protein-ligand interactions through molecular docking analysis. Fifteen phytomolecules with different biological profiles were preselected for study and

the druggability index of nucleolin's RBD domain was determined, which presented a value of 0.80, said site being highly druggable. Subsequently, molecular docking tests were carried out between the selected phytoconstituents and nucleolin. Results of the molecular docking assays revealed that the triterpenes Maytenin, Taraxerol, Cucurbitacin B, and Pristimerin have a higher *in silico* binding affinity, with interaction free energies (ΔG) equal to -10.80 ± 0.03 kcal.mol⁻¹, -10.58 ± 0.14 kcal.mol⁻¹, -9.58 ± 0.12 kcal.mol⁻¹ and -9.48 ± 0.35 kcal.mol⁻¹ respectively. The residues actively involved in the interactions with biomolecules, stabilizing the formation and the structure of the protein-ligand complexes were Asn100, Tyr103, Tyr134 and Arg158. The findings suggest that these triterpenes could act as potential nucleolin inhibitors due to the affinities found, however, these results need to be confirmed by *in vitro* and *in vivo* assays.

Keywords: Molecular docking, phytomolecules, inhibitors, nucleolin

INTRODUCCIÓN

La nucleolina (NCL) es una proteína multifuncional presente en las células eucariotas, cumple funciones vitales, principalmente en la proliferación celular, la replicación y reparación del ADN y en la expresión de proteínas; debido a esto, su presencia en las etapas tempranas del cáncer es esencial para el desarrollo de los tumores (Carvalho et al., 2021). En etapas tardías del cáncer cumple funciones de supervivencia de células malignas, promoviendo la anulación de la apoptosis, la angiogénesis y la regulación de la expresión de la proteína p53, mediante la asociación con el ARN mensajero (ARNm) que codifica dicha proteína (Abdelmohsen y Gorospe, 2012). Por lo que la regulación de las actividades de la nucleolina en células cancerosas es de suma importancia para combatir al proceso de carcinogénesis en etapas temprana.

El desarrollo de nuevos fármacos en la actualidad requiere del cumplimiento de requisitos que conllevan una gran cantidad de tiempo y dinero, con la finalidad de reducir estos factores, la primera etapa (búsqueda de moléculas con potenciales farmacológicos) se lleva a cabo mediante el empleo de poderosas plataformas bioinformáticas, que nos permiten conocer y predecir molé-

culas que presenten mejores perfiles energéticos de afinidades en la interacción (receptor-ligando) con el sitio activo de las proteínas diana (macromoléculas que deseamos inactivar o bloquear; Anwar et al., 2021).

Las plantas son fuente de una gran cantidad de compuestos químicos (fitoconstituyentes) a los cuales se denominan de forma genérica metabolitos secundarios. Estos fitoconstituyentes cumplen numerosas funciones en la planta como ser la defensa ante ataques o alguna amenaza, la atracción de polinizadores y en algunos casos, son simples productos de desecho (Ringuelet y Viña, 2013). Varios estudios han señalado que ciertos tipos de metabolitos secundarios, como los alcaloides, los terpenoides y los polifenoles, inhiben el crecimiento y desarrollo celular, también se ha observado que son capaces de inhibir la angiogénesis y regular la expresión o las actividades de algunas proteínas que tienen un papel importante en la resistencia a fármacos de las células cancerosas (Wink, 2015).

Por estos motivos, el objetivo principal de esta investigación fue detectar moléculas de origen vegetal que presenten afinidades de interacción por el dominio de unión al ARN de la nucleolina y caracterizar dichas uniones mediante herramientas computacionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de estructuras químicas de fitoconstituyentes con actividades biológicas

Primeramente, se realizó la búsqueda bibliográfica de moléculas de origen vegetal que presentan experimentalmente actividades biológicas como antioxidantes. Se seleccionaron un total de quince fitomoléculas y posteriormente se procedió a obtener los archivos de las estructuras químicas bidimensionales de cada una de estas moléculas de la base de datos PubChem (Kim et al., 2016).

Determinación de la drogabilidad del dominio DUA

La estructura molecular de la proteína humana NCL (PDB: 2KRR; Arumugam et al., 2010) se obtuvo de la base de datos Protein Data Bank (Berman et al., 2000). Posteriormente se procedió a determinar el índice de drogabilidad del dominio de unión al ARN de la nucleolina, para ello se realizó una caracterización de los sitios activos posibles empleando la herramienta DoGSiteScorer (Volkamer et al., 2012).

Acoplamiento molecular entre la nucleolina y los fitoconstituyentes seleccionados

Las estructuras moleculares de la NCL y las quince fitomoléculas seleccionadas fueron provistas de átomos de hidrógenos polares que cumplen con un papel importante para las interacciones, este paso se realizó empleando un pH fisiológico de 7,4. Posteriormente, se llevó a cabo la auto-optimización de las moléculas utilizando el campo de fuerza MMFF94 hasta el alcance de un estado energético favorable, para ello se empleó el programa Avogadro y el programa UCSF Chimera versión 1.14 (Pettersen et al., 2004; Hanwell et al., 2012).

Los ensayos computacionales de acoplamiento molecular entre los fitoconstituyentes y la nucleolina se llevaron a cabo empleando una grilla

de interacción de dimensiones 42x43x52 Å³, para esto se utilizó el programa AutoDock Vina (Trott y Olson, 2010).

Como control se utilizó al Paracetamol ya que interactúa con el sitio activo de la NCL en una región muy superior del mismo y con una energía libre de interacción muy desfavorable.

La visualización de los resultados y la determinación de las interacciones intermoleculares de los complejos receptor-ligando se llevaron a cabo empleando los programas UCSF Chimera versión 1.14 (Pettersen et al., 2004) y UCSF ChimeraX versión 1.21 (Pettersen et al., 2021). La determinación de los residuos activos y las interacciones intermoleculares involucradas en la formación del complejo se realizó empleando el programa PoseView (Fricker et al., 2004; Stierand et al., 2006).

Posteriormente, se seleccionaron aquellos ligandos que presentaron energías libres de interacción (ΔG) menores a -8,5 kcal.mol⁻¹, para ser sometidas a ensayos de acoplamientos exhaustivos con la finalidad de reducir los posibles errores en las simulaciones de acoplamiento molecular.

Análisis estadístico de datos

Los datos obtenidos en las simulaciones fueron analizados mediante la prueba de normalidad y la prueba de Kruskal-Wallis. Para ello se utilizó el programa PAST versión 3.23 (Hammer et al., 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se pudo detectar la presencia de un sitio drogable presente en el dominio DUA, una región con un alto valor de drogabilidad (0,80), la misma comprende una superficie de 2524 Å² y un volumen de 1174,85 Å³, este índice de drogabilidad estimado nos sugiere que esta región de la proteína presenta propiedades óptimas para buscar y diseñar moléculas que puedan demostrar aptitudes para actuar como potencial inhibidor de

dicho dominio (Figura 1). El término drogabilidad se refiere al potencial que presenta una diana (ligada a la modificación de una enfermedad) de ser regulada mediante moléculas biodisponibles ingeridas por vía oral (Volkamer et al., 2012).

Este sitio activo presenta un total de 284 átomos alojados en dicha región, de los cuales 198 átomos son de carbono (C), 38 átomos de nitrógeno (N) y 48 átomos de oxígeno (O). Entre los mismos, se pudieron identificar grupos funcionales (37) que intervienen regularmente en la formación de puentes de hidrógeno como donadores, un total de 94 grupos funcionales que participan en la recepción de los puentes de hidrógeno y 140 grupos funcionales que participan en interacciones hidrofóbicas (Tabla 1).

En cuanto a la composición de los residuos, el sitio drogable cuenta con un 28% de aminoácidos apolares representado por Ala (1), Ile (3), Leu (4), Phe (4), Pro (2), Val (1), un 28% de aminoácidos polares representado por Asn (3), Gln (1), Gly (5), Thr (2), Tyr (4), un 25% de aminoácidos positivos representado por Arg (3), Lys (10) y un 19% de aminoácidos negativos representados por Asp (2) y Glu (8) (Tabla 1).

Los residuos son de suma importancia en la estructura del receptor, ya que son los portadores de los átomos y por ende grupos funcionales, los

cuales son capaces de generar las interacciones intermoleculares que estabilizarán la formación del complejo receptor-ligando, dichas interacciones pueden ser del tipo: hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, apilamientos de orbitales π , de van der Waals, puentes de hidrógeno débiles o no convencionales, puentes salinos, apilamientos aromáticos e interacciones electrostáticas catión- π (Ferreira de Freitas y Schapira, 2017).

Las pruebas de acoplamiento molecular revelaron valores de energía libre de interacción (ΔG) entre $-10,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$ en el caso del ligando Maytenina y $-6,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$ en el caso de la Cloroquina. En base a estos valores energéticos se procedió a seleccionar los constituyentes Maytenina, Taraxerol, Cucurbitacina B, Pristimerina, Uncarina C, Intrapetacina A y Rotenona, las cuales demostraron energías libres de interacción favorables con valores menores $-8,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (Figura 2, Tabla 2).

Estos valores representan el cambio de energía causado por la formación del complejo NCL-fitomolécula, que es el resultado de las propiedades fisicoquímicas tanto de los residuos que componen el sitio activo de la proteína, así como las propiedades de los ligandos analizados (Baig et al., 2018). Es importante destacar que la energía de acoplamiento obtenida en estas si-

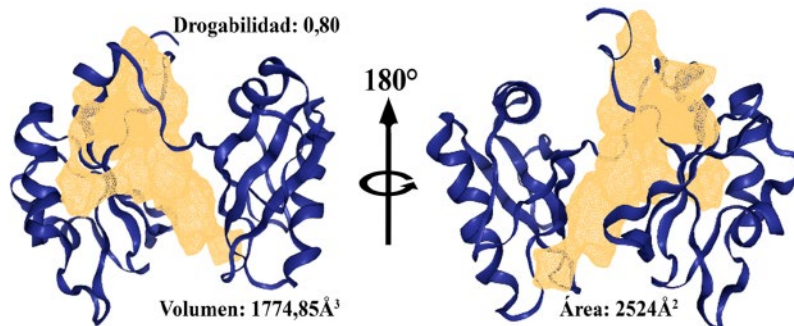


Figura 1. A, B. Sitio drogable (región en amarillo) identificado en el dominio de unión al ARN (DUA) de la nucleolina humana (PDB: 2KRR)

Tabla 1. Descriptores del sitio activo del dominio de unión al ARN (DUA) de la nucleolina humana

Elementos	N	Grupos Funcionales	N	Composición de Residuos	N	Residuos	N
Átomos en el sitio activo	284	Donadores en puentes de hidrógeno	37	Relación de aminoácidos apolares	0,28	Ala	1
						Arg	3
						Asn	3
						Asp	2
						Gln	1
Carbono	198	Receptores en puentes de hidrógeno	94	Relación de aminoácidos polares	0,28	Glu	8
						Gly	5
						Ile	3
						Leu	4
						Lys	10
Nitrógeno	38	Interacciones hidrofóbicas	140	Relación de aminoácidos positivos	0,25	Phe	4
						Pro	2
						Thr	2
						Tyr	4
Oxígeno	48	Relación de hidrofobicidad del segmento	0,52	Relación de aminoácidos negativos	0,19	Val	1

N: Número

mulaciones solo son aproximaciones, debido que desafortunadamente la entropía del sistema es difícil considerar en un ensayo computacional, por lo que resulta complicado que estos valores se ajusten a la energía libre de unión nativa (Guedes et al., 2013).

La Maytenina interactúa con el centro del sitio activo de la NCL humana, presenta una energía de interacción de $-10,80 \pm 0,03$ kcal.mol⁻¹. Los residuos activos involucrados en la formación del complejo son Tyr134, Phe50 y Phe11. Esta molécula interactúa con el residuo Tyr134 formando principalmente puentes de hidrógeno del tipo O-H---O con la misma, también se registró la formación de interacciones de van der Waals entre la Maytenina y los residuos Phe50 y Phe11 (Figura 3 A).

Es importante resaltar que las interacciones hidrofóbicas y los puentes de hidrógeno son las más frecuentes e importantes en la formación de los complejos receptor-ligando, las interacciones hidrofóbicas se dan con mucha frecuencia y

son el resultado de la interacción entre átomos carbono, carbono y algún halógeno o carbono y átomos de azufre, por otra parte los puentes de hidrógeno se dan como resultado del nexo entre un átomo de hidrógeno y un átomo electroestáticamente muy negativo (O, N, S), sin embargo en los complejos receptor-ligando los puentes de hidrógeno más comunes son los del tipo N-H---O y O-H---O (Ferreira de Freitas y Schapira, 2017; Bulusu y Desiraju, 2020) (Figura 3 A).

A su vez el complejo formado con la Pristimerina demostró afinidad de interacción con la región central del sitio activo de la NCL, con una energía de interacción de $-9,48 \pm 0,35$ kcal.mol⁻¹. El residuo involucrado activamente en la estabilización de la estructura del complejo formado fue la Tyr103. Se pudo identificar entre este residuo y el ligando la formación de un puente de hidrógeno del tipo O-H---O (Figura 3 B).

La Maytenina y la Pristimerina son compuestos presentes en las hojas y rizoma de los géneros *Monteverdia* y *Celastrus*, presentan actividades

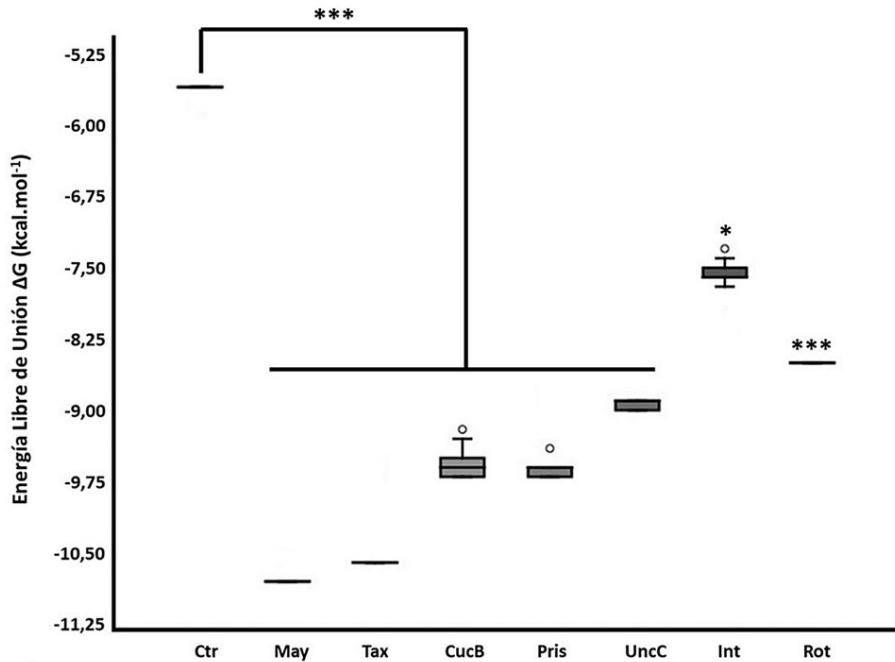


Figura 2. Energía de unión de las fitomoléculas seleccionadas para el análisis exhaustivo. * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$. Ctr: Control, May: Maytenina, Tax: Taraxerol, CucB: Cucurbitacina B, Pris: Pristimerina, UncC: Uncarina C, Int: Intrapetacina, Rot: Rotenona

antiinflamatorias, anticancerígenas, abortivas, antiulcerogénica y antirreumática (Akhtar y Swamy, 2018). Entre las actividades anticancerígenas se pueden citar la actividad antiproliferativa y pro-apoptótica en células del carcinoma escamoso de cabeza y cuello, además de la regulación negativa de ARNmi-27a y ARNmi-20a (Akhtar y Swamy, 2018; Hernandez et al., 2020).

De igual manera, el complejo formado con la molécula de Taraxerol, demostró una mayor afinidad de interacción por la región central del sitio activo de la NCL, con una energía libre de interacción de $-10,58 \pm 0,14$ kcal.mol⁻¹. Los residuos activos implicados en la estabilización de la estructura fueron la Asn100, la Phe50, Phe11 y la Lys130 (Figura 4A).

Las interacciones intermoleculares que fueron registradas con la molécula de Taraxerol fueron puentes de hidrógeno del tipo O-H---O con el

residuo Asn100, e interacciones adicionales del tipo van der Waals con los residuos Phe11, Phe50 y Lys130 (Figura 4A).

El Taraxerol es un compuesto orgánico presente en las raíces, los rizomas, las partes aéreas y en las semillas de una gran variedad de familias vegetales, presenta actividades antiinflamatorias, anticancerígenas y potenciales actividades antimicrobianas (Zafar y Sharma, 2015).

Estudios revelaron que esta molécula también presenta actividades antitumorales ante la transformación de células de la piel a células cancerígenas mediante la inducción con 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) (Takasaki et al., 1999). Esta molécula induce a la apoptosis e inhibe el ciclo celular en el colesteatoma epitelial de oído medio al inhibir la expresión del grupo de proteínas NF-κB (Liao et al., 2018). También se ha registrado que es capaz de inducir a la

Tabla 2. Energía libre de interacción entre fitomoléculas y el dominio DUA de la nucleolina

Fitomoléculas	Especie	Órganos	PubChem CID	ΔG (kcal.mol ⁻¹)
Maytenina	<i>M. ilicifolia</i>	H, Ri (Akhtar & Swamy, 2018).	355376	-10,6
Taraxerol	<i>T. officinale</i>	R, T, C, H y S (Zafar & Sharma, 2015).	92097	-9,6
Cucurbitacina B	Cucurbitaceae	R, H (Tallamy et al., 2005).	5281316	-9,6
Pristimerina	<i>M. ilicifolia</i>	H, Ri (Akhtar & Swamy, 2018).	159516	-9,4
Uncarina C	<i>U. tomentosa</i>	R, T, C (Akhtar & Swamy, 2018).	10429112	-8,9
Intrapetacina A	<i>L. intrapetiolaris</i>	R (Oberlies et al., 2001).	44584771	-8,6
Rotenona	<i>Tephrosia sp.</i>	H, T, R, S, V (Irvine & Freyre, 1959)	6758	-8,5
3,5-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona	<i>C. sativus, T. toxicaria</i>	H (Thomas et al., 2012).	5379262	-8,3
Genisteina	Fabaceae	Tp (Kaufman et al., 1997).	5280961	-8,0
Ácido de caracasina	<i>C. caracasana</i>	F (Suárez et al., 2009).	122364134	-7,8
Lapachol	<i>H. impetiginosus</i>	C (Akhtar & Swamy, 2018).	3884	-7,7
Quinina	<i>C. officinalis</i>	C (Kacprzak, 2013).	3034034	-7,7
Uncarina F	<i>U. tomentosa</i>	R, T, C (Akhtar & Swamy, 2018).	12304288	-7,7
Quinidina	<i>C. officinalis</i>	C (Kacprzak, 2013).	441074	-7,5
Cloroquina	<i>C. officinalis</i>	C (Kacprzak, 2013).	2719	-6,4
Paracetamol*	—	—	1983	-5,6

*Testigo negativo, H: hojas, Ri: rizoma, R: raíz, T: tallo, C: corteza, S: semillas, V: vainas, Tp: toda la planta, F: Flores

apoptosis principalmente por la vía mitocondrial, liberando citocromo c al citosol y activando las caspasas 9 y 3 (Yao et al., 2017).

El complejo formado con la molécula de Cucurbitacina B registró una energía libre de interacción de $-9,58 \pm 0,12$ kcal.mol⁻¹, con afinidades de interacción por el sitio activo de la NCL. Los residuos que se encontraban participando activamente en la estabilización de la estructura del complejo fueron la Asn100, la Arg158, la Tyr134, la Phe11 y la Ile132. Se pudo identificar la formación de puentes de hidrógeno del tipo O-H...O con los residuos Asn100 y Tyr134, y puentes de hidrógeno del tipo N-H...O con el residuo Arg158, también se pudo detectar la formación de interacciones del tipo van der Waals con el residuo Phe11 y con el residuo Ile132 (Figura 4B).

La Cucurbitacina B es una molécula presente principalmente en las hojas y raíces de la familia

Cucurbitaceae, presenta actividades citotóxicas, inhibiendo principalmente el ciclo celular (Tallamy et al., 2005; Akhtar y Swamy, 2018). Los triterpenos son un grupo de compuestos orgánicos caracterizados por la presencia de un grupo isopreno en su estructura y presentan actividades tanto anticancerígenas, antiinflamatorias, antioxidantes, antivirales, antibacteriales como antifúngicas (Yin, 2012). Son un producto secundario del metabolismo de las plantas y se encuentran distribuidos comúnmente en forma de estructura pentacíclica, por todos los órganos de estas, a excepción de las flores (Jäger et al., 2009).

Su función como anticancerígenos la desempeñan inhibiendo la proliferación celular e induciendo la muerte de células tumorales teniendo como blanco múltiples tipos de dianas cancerígenas como la proteasoma, Bcl-2, NF-κB, el activador de transcripción y transductor 3 (STAT3), el

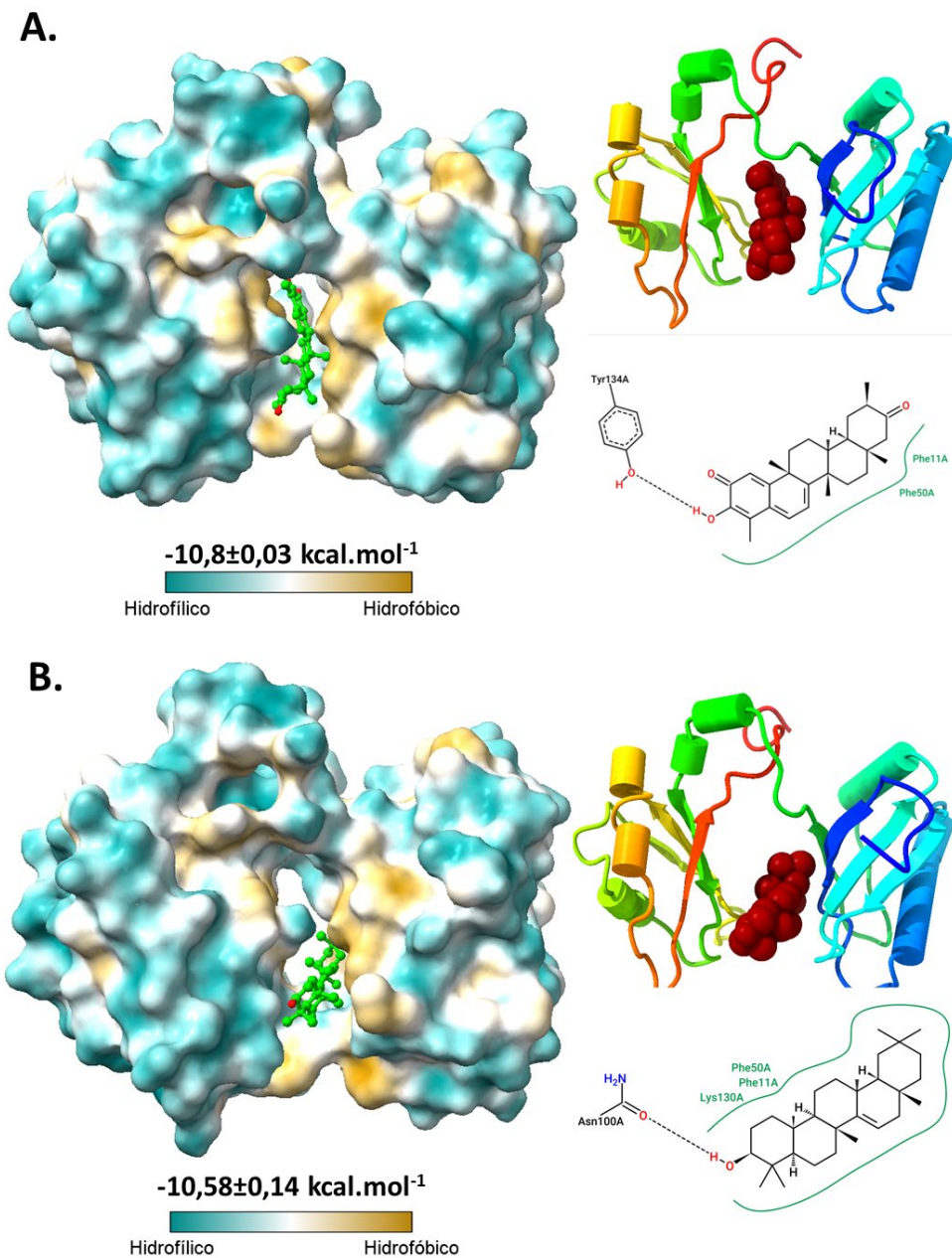


Figura 3. Modelo tridimensional de superficies del dominio DUA, modelo de tubos y planos del dominio DUA e interacciones intermoleculares presentes en el complejo receptor-ligando **A.** NCL-Maytenina. **B.** NCL-Pristimerina. Líneas punteadas negras: puentes de hidrógeno, línea verde continua: interacciones de van der Waals

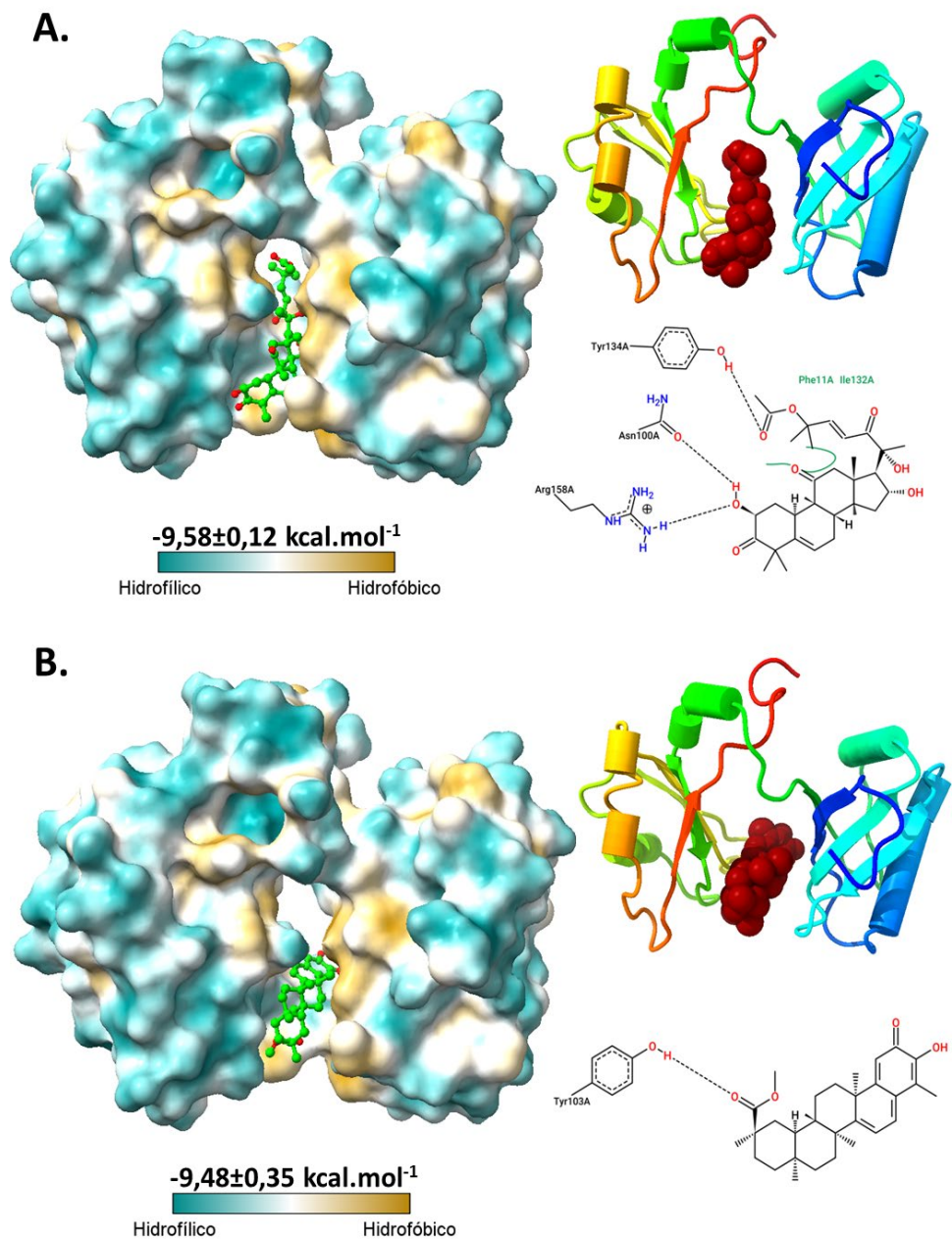


Figura 4. Modelo tridimensional de superficies del dominio DUA, modelo de tubos y planos del dominio DUA, e interacciones intermoleculares presentes en el complejo receptor-ligando **A.** NCL-Taraxerol. **B.** NCL-Cucurbitacina B. Líneas punteadas negras: puentes de hidrógeno, línea verde continua: interacciones de van der Waals

factor de necrosis tumoral (TNF), la angiogénesis y TLR (Gill et al., 2016). Sin embargo, las interacciones moleculares con la NCL aún no se han registrado en este grupo de moléculas.

La Maytenina y Pristimerina cuentan con diversas actividades anticancerígenas demostradas contra células de cáncer colorrectal (Yousef et al., 2016; Park y Kim, 2018; Zhao et al., 2021), cáncer pancreático (Wang et al., 2012; Deeb et al., 2014), cáncer de próstata (Yang et al., 2008; Lee et al., 2016), cáncer de pulmón (Li et al., 2020), cáncer de mama (Mu et al., 2012; Lee et al., 2013; Cevatemre et al., 2018; Zhao et al., 2019; Cheng et al., 2020;). Los mecanismos por los cuales logran inhibir el crecimiento de las células cancerígenas incluyen la inducción de la apoptosis, por medios como la activación de especies reactivas de oxígeno (ROS), inactivación de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e inhibición de proteínas que favorecen la supervivencia de células como AKT, NF-kB o mTOR (Deeb et al., 2014; Zhao et al., 2019). Además de bloquear la proliferación y migración de células, detiene el ciclo celular y causa autofagia (Wang et al., 2012; Chen et al., 2021).

El Taraxerol presenta actividades de inhibición del desarrollo en células del cáncer de epitelio gástrico (Tan, 2011), glioblastoma en ratones (Hong et al., 2016), cáncer de próstata (Surapaneni, 2019). Estas actividades las lleva a cabo induciendo la apoptosis por medio de un incremento en los niveles de caspasas, inhibiendo proteínas asociadas al ciclo celular, induciendo la autofagia, induciendo la fragmentación del ADN, deteniendo el ciclo celular e inhibiendo la migración celular (Tan, 2011; Hong et al., 2016; Surapaneni, 2019).

La Cucurbitacina B, a su vez cuenta con actividades anticancerígenas demostradas en diferentes estudios, en los cuales se mencionan a células del cáncer de mama (Dakeng et al., 2012; Duangmano et al., 2012; Sinha et al., 2016; Ditharot et al., 2019), cáncer de páncreas (Thoen-

nissen et al., 2009; Iwanski et al., 2010; Zhou et al., 2019), leucemia (Li, et al., 2010), carcinoma hepatocelular (Meng, et al., 2010), cáncer de pulmón (Lu et al., 2012), cáncer de próstata (Gao et al., 2014), cáncer de colon (Dandawate et al., 2020) y cáncer de laringe (Liu et al., 2010). Estas actividades anticancerígenas se llevan a cabo mediante la detención del ciclo celular, inhibición del factor de transcripción STAT3, inducción de la apoptosis, control de la metástasis y angiogénesis, inducción de la autofagia e inhibición de la polimerización de microtúbulos (Li, et al., 2010; Duangmano et al., 2010, 2012; Dakeng et al., 2012; Ren et al., 2015).

Los residuos activos involucrados en la estabilización de los complejos fueron la Arg158, la Asn100, la Ile132, la Lys130, la Phe11, la Phe50, la Tyr103 y la Tyr134 quienes participaban en la formación de puentes de hidrógeno e interacciones de contacto como la interacciones de van der Waals entre los residuos y estas moléculas candidatas, dichos residuos se encuentran ubicados en cuatro motivos de reconocimiento de ARN (RRM) que conforman el dominio de unión al ARN de la nucleolina (Tajrishi et al., 2011).

Si bien no se han registrado previamente interacciones de estas moléculas con la NCL, las actividades anticancerígenas mencionadas anteriormente podrían ser beneficiadas por debido a las interacciones que se generarían con la proteína NCL, por la cual podrían ser consideradas candidatas para futuras pruebas y estudios que involucren tanto a las moléculas recomendadas como la proteína NCL.

CONCLUSIONES

Los resultados hallados en este estudio sugieren que los triterpenos Maytenina, Taraxerol, Cucurbitacina B y Pristimerina fueron los que demostraron mayores afinidades de interacción con el sitio activo DUA de las nucleolinas, pudiendo presentar actividades inhibitorias de las funciones

de la nucleolina. Si bien estos hallazgos computacionales podrían arrojar algunos indicios de las afinidades de estos triterpenos con esta proteína, sin embargo, se recomienda realizar simulaciones exhaustivas de dinámica molecular, así como ensayos experimentales de titulación calorimétrica isotérmica y cristalografía de los complejos.

APORTES DE LOS AUTORES

SG: Elaboración del diseño metodológico del estudio, pruebas y análisis computacional, escritura del artículo científico. EGM: Aportes en el diseño metodológico, aportes en el análisis estadístico de los resultados, aportes en la escritura del artículo científico. LM: Aportes en el diseño del estudio, aportes en la escritura del artículo científico.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2012). RNA-binding protein nucleolin in disease. *RNA Biology*, *9*(6), 799–808. <https://doi.org/10.4161/rna.19718>

Akhatar, M. S., & Swamy, M. K. (2018). Anticancer plants: Properties and application. In *Anticancer plants: Properties and Application* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8548-2>

Anwar, T., Kumar, P., & Khan, A. U. (2021). Modern Tools and Techniques in Computer-Aided Drug Design. In *Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design* (pp. 1–30). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822312-3.00011-4>

Arumugam, S., Clarke Miller, M., Maliekal,

J., Bates, P. J., Trent, J. O., & Lane, A. N. (2010). Solution structure of the RBD1,2 domains from human nucleolin. *Journal of Biomolecular NMR*, *47*(1), 79–83. <https://doi.org/10.1007/s10858-010-9412-1>

Baig, M. H., Ahmad, K., Rabbani, G., Danishuddin, M., & Choi, I. (2018). Computer Aided Drug Design and its Application to the Development of Potential Drugs for Neurodegenerative Disorders. *Current Neuropharmacology*, *16*(6), 740–748. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666171016163510>

Berman, H., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T., & Weissig, H. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, *28*(1), 235–242.

Bulusu, G., & Desiraju, G. R. (2020). Strong and Weak Hydrogen Bonds in Protein–Ligand Recognition. *Journal of the Indian Institute of Science*, *100*(1), 31–41. <https://doi.org/10.1007/s41745-019-00141-9>

Carvalho, L. S., Gonçalves, N., Fonseca, N. A., & Moreira, J. N. (2021). Cancer Stem Cells and Nucleolin as Drivers of Carcinogenesis. *Pharmaceuticals*, *14*(60), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ph14010060>

Cevatemre, B., Erkisa, M., Aztopal, N., Karakas, D., Alper, P., Tsimplouli, C., Sereti, E., Dimas, K., Armutak, E. I. I., Gurevin, E. G., Uvez, A., Mori, M., Berardozzi, S., Ingallina, C., D'Acquarica, I., Botta, B., Ozpolat, B., & Ulukaya, E. (2018). A promising natural product, pristimerin, results in cytotoxicity against breast cancer stem cells in vitro and xenografts in vivo through apoptosis and an incomplete autophagy in breast cancer. *Pharmacological Research*, *129*, 500–514. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.11.027>

Chan, K. T., Li, K., Liu, S. L., Chu, K. H., Toh, M., & Xie, W. D. (2010). Cucurbitacin B inhibits STAT3 and the Raf/MEK/ERK pathway in leukemia cell line K562. *Cancer Letters*, *289*(1), 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.can>

- let.2009.07.015
- Chan, K. T., Meng, F. Y., Li, Q., Ho, C. Y., Lam, T. S., To, Y., Lee, W. H., Li, M., Chu, K. H., & Toh, M. (2010). Cucurbitacin B induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in BEL-7402 human hepatocellular carcinoma cells and is effective via oral administration. *Cancer Letters*, 294(1), 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.01.029>
- Chen, R.-Z., Yang, F., Zhang, M., Sun, Z.-G., & Zhang, N. (2021). Cellular and Molecular Mechanisms of Pristimerin in Cancer Therapy: Recent Advances. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.671548>
- Cheng, S., Zhang, Z., Hu, C., Xing, N., Xia, Y., & Pang, B. (2020). Pristimerin Suppressed Breast Cancer Progression via miR-542-5p/DUB3 Axis. *OncoTargets and Therapy*, Volume 13, 6651–6660. <https://doi.org/10.2147/OTT.S257329>
- Dakeng, S., Duangmano, S., Jiratchariyakul, W., U-Pratya, Y., Bögler, O., & Patmasiriwat, P. (2012). Inhibition of Wnt signaling by cucurbitacin B in breast cancer cells: Reduction of Wnt-associated proteins and reduced translocation of galectin-3-mediated β -catenin to the nucleus. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(1), 49–60. <https://doi.org/10.1002/jcb.23326>
- Dandawate, P., Subramaniam, D., Panovich, P., Standing, D., Krishnamachary, B., Kaushik, G., Thomas, S. M., Dhar, A., Weir, S. J., Jensen, R. A., & Anant, S. (2020). Cucurbitacin B and I inhibits colon cancer growth by targeting the Notch signaling pathway. *Scientific Reports*, 10(1), 1290. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57940-9>
- Deeb, D., Gao, X., Liu, Y. B., Pindolia, K., & Gautam, S. (2014). Pristimerin, a quinone-methide triterpenoid, induces apoptosis in pancreatic cancer cells through the inhibition of pro-survival Akt/NF- κ B/mTOR signaling proteins and anti-apoptotic Bcl-2. *International Journal of Oncology*, 44(5), 1707–1715. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2325>
- Dittharot, K., Dakeng, S., Suebsakwong, P., Suksamrarn, A., Patmasiriwat, P., & Promkan, M. (2019). Cucurbitacin B Induces Hypermethylation of Oncogenes in Breast Cancer Cells. *Planta Medica*, 85(05), 370–378. <https://doi.org/10.1055/a-0791-1591>
- Duangmano, S., Dakeng, S., Jiratchariyakul, W., Suksamrarn, A., Smith, D. R., & Patmasiriwat, P. (2010). Antiproliferative Effects of Cucurbitacin B in Breast Cancer Cells: Down-Regulation of the c-Myc/hTERT/Telomerase Pathway and Obstruction of the Cell Cycle. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(12), 5323–5338. <https://doi.org/10.3390/ijms11125323>
- Duangmano, S., Sae-lim, P., Suksamrarn, A., Patmasiriwat, P., & Domann, F. E. (2012). Cucurbitacin B Causes Increased Radiation Sensitivity of Human Breast Cancer Cells via G2/M Cell Cycle Arrest. *Journal of Oncology*, 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/601682>
- Ferreira de Freitas, R., & Schapira, M. (2017). A systematic analysis of atomic protein–ligand interactions in the PDB. *MedChemComm*, 8(10), 1970–1981. <https://doi.org/10.1039/C7MD00381A>
- Fricker, P., Gastreich, M., & Rarey, M. (2004). Automated Generation of Structural Molecular Formulas under Constraints. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 44, 1065–1078.
- Gao, Y., Islam, M. S., Tian, J., Lui, V. W. Y., & Xiao, D. (2014). Inactivation of ATP citrate lyase by Cucurbitacin B: A bioactive compound from cucumber, inhibits prostate cancer growth. *Cancer Letters*, 349(1), 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.03.015>
- Gill, B. S., Kumar, S., & Navgeet. (2016). Triterpenes in cancer: significance and their influence. *Molecular Biology Reports*, 43(9), 881–896. <https://doi.org/10.1007/s11033-016->

- 4032-9
- Guedes, I. A., de Magalhães, C. S., & Dardenne, L. E. (2013). Receptor-ligand molecular docking. *Biophysical Reviews*, 6(1), 75–87. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0130-2>
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST : Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Electronica*, 4(1), 9.
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(1), 1–17.
- Hernandes, C., Miguita, L., de Sales, R. O., Silva, E. de P., Mendonça, P. O. R. de, Lorencini da Silva, B., Klingbeil, M. de F. G., Mathor, M. B., Rangel, E. B., Marti, L. C., Coppede, J. da S., Nunes, F. D., Pereira, A. M. S., & Severino, P. (2020). Anticancer Activities of the Quinone-Methide Triterpenes Maytenin and 22-β-hydroxymaytenin Obtained from Cultivated *Maytenus ilicifolia* Roots Associated with Down-Regulation of miRNA-27a and miR-20a/miR-17-5p. *Molecules*, 25(3), 760. <https://doi.org/10.3390/molecules25030760>
- Hong, J. F., Song, Y. F., Liu, Z., Zheng, Z. C., Chen, H. J., & Wang, S. S. (2016). Anticancer activity of taraxerol acetate in human glioblastoma cells and a mouse xenograft model via induction of autophagy and apoptotic cell death, cell cycle arrest and inhibition of cell migration. *Molecular Medicine Reports*, 13(6), 4541–4548. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5105>
- Irvine, J. E., & Freyre, R. H. (1959). Source Materials for Rotenone, Occurrence of Rotenoids in Some Species of the Genus *Tephrosia*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7(2), 106–107. <https://doi.org/10.1021/jf60096a002>
- Iwanski, G. B., Lee, D. H., En-Gal, S., Doan, N. B., Castor, B., Vogt, M., Toh, M., Bokemeyer, C., Said, J. W., Thoennissen, N. H., & Koefler, H. P. (2010). Cucurbitacin B, a novel in vivo potentiator of gemcitabine with low toxicity in the treatment of pancreatic cancer. *British Journal of Pharmacology*, 160(4), 998–1007. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00741.x>
- Jäger, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M. N., & Scheffler, A. (2009). Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules*, 14(6), 2016–2031. <https://doi.org/10.3390/molecules14062016>
- Kacprzak, M. K. (2013). Chemistry and Biology of Cinchona Alkaloids. In K. G. Ramawat & J. M. Mérillon (Eds.), *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (pp. 1–4242). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6>
- Kaufman, P. B., Duke, J. A., Briemann, H., Boik, J., & Hoyt, J. E. (1997). A Comparative Survey of Leguminous Plants as Sources of the Isoflavones, Genistein and Daidzein: Implications for Human Nutrition and Health. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 3(1), 7–12. <https://doi.org/10.1089/acm.1997.3.7>
- Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E., Chen, J., Fu, G., & Gindulyte, A. (2016). PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res*, 1, 1202–1213.
- Lee, J. S., Yoon, I. S., Lee, M. S., Cha, E. Y., Thuong, P. T., Diep, T. T., & Kim, J. R. (2013). Anticancer Activity of Pristimerin in Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive SKBR3 Human Breast Cancer Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(2), 316–325. <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00685>
- Lee, S.-O., Kim, J.-S., Lee, M.-S., & Lee, H.-J. (2016). Anti-cancer effect of pristimerin by

- inhibition of HIF-1 α involves the SPHK-1 pathway in hypoxic prostate cancer cells. *BMC Cancer*, 16(1), 701. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2730-2>
- Li, J., Guo, Q., Lei, X., Zhang, L., Su, C., Liu, Y., Zhou, W., Chen, H., Wang, H., Wang, F., Yan, Y., & Zhang, J. (2020). Pristimerin induces apoptosis and inhibits proliferation, migration in H1299 Lung Cancer Cells. *Journal of Cancer*, 11(21), 6348–6355. <https://doi.org/10.7150/jca.44431>
- Liao, J., Wu, F., Lin, W., & Huang, Z. (2018). Taraxerol exerts potent anticancer effects via induction of apoptosis and inhibition of Nf-Kb signalling pathway in human middle ear epithelial cholesteatoma cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 17(6), 1011–1017. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v17i6.5>
- Liu, T., Peng, H., Zhang, M., Deng, Y., & Wu, Z. (2010). Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. *European Journal of Pharmacology*, 641(1), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.04.062>
- Lu, P., Yu, B., & Xu, J. (2012). Cucurbitacin B Regulates Immature Myeloid Cell Differentiation and Enhances Antitumor Immunity in Patients with Lung Cancer. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 27(8), 495–503. <https://doi.org/10.1089/cbr.2012.1219>
- Mu, X.-M., Shi, W., Sun, L.-X., Li, H., Wang, Y.-R., Jiang, Z.-Z., & Zhang, L.-Y. (2012). Pristimerin Inhibits Breast Cancer Cell Migration by Up-regulating Regulator of G Protein Signaling 4 Expression. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(4), 1097–1104. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.4.1097>
- Oberlies, N. H., Burgess, J. P., Navarro, H. A., Pinos, R. E., Soejarto, D. D., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Wani, M. C., & Wall, M. E. (2001). Bioactive Constituents of the Roots of *Licania inrapetiolaris*. *Journal of Natural Products*, 64(4), 497–501. <https://doi.org/10.1021/np0005006>
- Park, J.-H., & Kim, J.-K. (2018). Pristimerin, a naturally occurring triterpenoid, attenuates tumorigenesis in experimental colitis-associated colon cancer. *Phytomedicine*, 42, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.03.033>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, 30(1), 70–82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>
- Ren, G., Sha, T., Guo, J., Li, W., Lu, J., & Chen, X. (2015). Cucurbitacin B induces DNA damage and autophagy mediated by reactive oxygen species (ROS) in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Natural Medicines*, 69(4), 522–530. <https://doi.org/10.1007/s11418-015-0918-4>
- Ringuelet, J., & Viña, S. (2013). *Productos Naturales Vegetales (1a ed.)*. Universidad Nacional de la Plata.
- Sinha, S., Khan, S., Shukla, S., Lakra, A. D., Kumar, S., Das, G., Maurya, R., & Meeran, S. M. (2016). Cucurbitacin B inhibits breast cancer metastasis and angiogenesis through VEGF-mediated suppression of FAK/MMP-9 signaling axis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 77, 41–56. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.05.014>
- Sterand, K., Maaß, P., & Rarey, M. (2006). Complexes at a Glance: Automated Generation of two-dimensional Complex Diagrams. *Molecular Bioinformatics*, 22, 1710–1716.

- Suárez, A. I., Chavez, K., Mateu, E., Compagnone, R. S., Muñoz, A., Sojo, F., Arvelo, F., Mijares, M., & De Sanctis, J. B. (2009). Cytotoxic Activity of seco -Entkaurenes from *Croton caracasana* on Human Cancer Cell Lines. *Natural Product Communications*, 4(11), 1934578X0900401. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900401117>
- Surapaneni, S. (2019). *Apoptosis of LNCaP and PC-3 cell lines and testosterone-induced prostate cancer by taraxerol and reticulatin isolated from Annona reticulata l.* (Vol. 1, Issue 1). ABMRCP.
- Tajrishi, M. M., Tuteja, R., & Tuteja, N. (2011). Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Communicative and Integrative Biology*, 4(3), 267–275. <https://doi.org/10.4161/cib.4.3.14884>
- Takasaki, M., Konoshima, T., Tokuda, H., Masuda, K., Arai, Y., Shiojima, K., & Ageta, H. (1999). Anti-carcinogenic Activiti of Taraxacum Plant. II. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 22(6), 606–610.
- Tallamy, D. W., Hibbard, B. E., Clark, T. L., & Gillespie, J. J. (2005). Western Corn Rootworm, Cucurbits and Cucurbitacins Purported Origin of Western Corn Rootworm. In S. Vidal, B. E. Hibbard, T. L. Clark, & J. J. Gillespie (Eds.), *Western Corn Rootworm: Ecology and Management* (pp. 67–94). CAB Internarional.
- Tan, B. (2011). Effects of taraxerol and taraxeryl acetate on cell cycle and apoptosis of human gastric epithelial cell line AGS. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 9(6), 638–642. <https://doi.org/10.3736/jcim20110610>
- Thoennissen, N. H., Iwanski, G. B., Doan, N. B., Okamoto, R., Lin, P., Abbassi, S., Song, J. H., Yin, D., Toh, M., Xie, W. D., Said, J. W., & Koeffler, H. P. (2009). Cucurbitacin B Induces Apoptosis by Inhibition of the JAK/STAT Pathway and Potentiates Antiproliferative Effects of Gemcitabine on Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Research*, 69(14), 5876–5884. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0536>
- Thomas, C. M., Wood, R. C., Wyatt, J. E., Pendleton, M. H., Torrenegra, R. D., Rodriguez, O. E., Harirforoosh, S., Ballester, M., Lightner, J., Krishnan, K., & Ramsauer, V. P. (2012). Anti-neoplastic activity of two flavone isomers derived from *Gnaphalium elegans* and *achyrocline bogotensis*. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039806>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Volkamer, A., Kuhn, D., Grombacher, T., Rippmann, F., & Rarey, M. (2012). Combining global and local measures for structure-based druggability predictions. *J. Chem. Inf. Model.*, 52, 360–372.
- Wang, Y., Zhou, Y., Zhou, H., Jia, G., Liu, J., Han, B., Cheng, Z., Jiang, H., Pan, S., & Sun, B. (2012). Pristimerin Causes G1 Arrest, Induces Apoptosis, and Enhances the Chemosensitivity to Gemcitabine in Pancreatic Cancer Cells. *PLoS ONE*, 7(8), e43826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043826>
- Wink, M. (2015). Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines*, 2, 251–286. <https://doi.org/10.3390/medicines2030251>
- Yang, H., Landis-Piwowar, K. R., Lu, D., Yuan, P., Li, L., Reddy, G. P.-V., Yuan, X., & Dou, Q. P. (2008). Pristimerin induces apoptosis by targeting the proteasome in prostate cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(1), 234–244. <https://doi.org/10.1002/jcb.21399>
- Yao, X., Lu, B., Lü, C., Bai, Q., Yan, D., & Xu, H. (2017). Taraxerol Induces Cell Apoptosis through A Mitochondria-Mediated Pathway

- in HeLa Cells. *Cell Journal*, 19(3), 512–519. <https://doi.org/10.22074/cellj.2017.4543>.
- Yin, M. C. (2012). Anti-glycative potential of triterpenes: A mini-review. In *BioMedicine (Netherlands)* (Vol. 2, Issue 1, pp. 2–9). No longer published by Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biomed.2011.12.001>
- Yousef, B. A., Hassan, H. M., Guerram, M., Hamdi, A. M., Wang, B., Zhang, L.-Y., & Jiang, Z.-Z. (2016). Pristimerin inhibits proliferation, migration and invasion, and induces apoptosis in HCT-116 colorectal cancer cells. *Bio-medicine & Pharmacotherapy*, 79, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.02.003>
- Zafar, R., & Sharma, K. (2015). Occurrence of taraxerol and taraxasterol in medicinal plants. *Pharmacognosy Reviews*, 9(17), 19. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.156317>
- Zhao, Q., Bi, Y., Guo, J., Liu, Y., Zhong, J., Liu, Y., Pan, L., Guo, Y., Tan, Y., & Yu, X. (2021). Effect of pristimerin on apoptosis through activation of ROS/ endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated noxa in colorectal cancer. *Phytomedicine*, 80, 153399. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153399>
- Zhao, Q., Liu, Y., Zhong, J., Bi, Y., Liu, Y., Ren, Z., Li, X., Jia, J., Yu, M., & Yu, X. (2019). Pristimerin induces apoptosis and autophagy via activation of ROS/ASK1/JNK pathway in human breast cancer in vitro and in vivo. *Cell Death Discovery*, 5(1), 125. <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0208-0>
- Zhou, J., Liu, M., Chen, Y., Xu, S., Guo, Y., & Zhao, L. (2019). Cucurbitacin B suppresses proliferation of pancreatic cancer cells by ceRNA: Effect of miR-146b-5p and lncRNA-AFAP1-AS1. *Journal of Cellular Physiology*, 234(4), 4655–4667. <https://doi.org/10.1002/jcp.27264>

Producción de biomasa líquida de levaduras cerveceras en un medio de cultivo alternativo

Maciel, N. 

Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biotecnología. Carrera de Biotecnología

* E-mail del autor: nayadegisselle@gmail.com

Producción de biomasa líquida de levaduras cerveceras en un medio de cultivo alternativo.

Las levaduras, especialmente las que pertenecen a la familia Saccharomycetaceae, se utilizan desde hace siglos para la obtención de diversos productos, como lo son los alimentos y bebidas fermentadas. En este sentido, la elevada demanda de los productos de fermentaciones en las últimas décadas ha generado un aumento en la producción de biomasa de levadura a nivel industrial. En particular, en Paraguay, ha aumentado el número de cervecerías artesanales, quienes mayoritariamente importan la materia prima como levadura seca, debido a las facilidades que esta presenta en cuanto al costo y mantenimiento. Teniendo en cuenta esta brecha aprovechable, se comparó el crecimiento de dos levaduras cerveceras; *Saccharomyces cerevisiae* SafAle US-05 empleada para la fabricación de cerveza tipo Ale y *Saccharomyces pastorianus* SafLager S-23 utilizada para la fabricación de cerveza tipo Lager en el medio de cultivo tradicional YPD y en un medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña clarificada; las fermentaciones de las levaduras se realizaron en matraces para una evaluación preliminar del comportamiento de las mismas en la formulación del medio utilizado. Como resultado principal obtenido tenemos que el Nivel de Biomasa de *S. cerevisiae* en YPD fue de 16,57 g/L y en el medio alternativo fue de 12,96 g/L; mientras que, en *S. pastorianus* fue de 14,22 g/L y 9,37 g/L. El nivel de biomasa aceptable nos indica que la producción de biomasa líquida de ambas levaduras cerveceras mediante fermentación en medio a base de melaza, resulta ser un proceso biotecnológico factible y rentable.

Palabras clave: *Saccharomyces*, biomasa líquida, melaza de caña

Brewer's yeast liquid biomass production in an alternative culture medium. Yeasts, especially those belonging to the Saccharomycetaceae family, have been used for centuries to obtain various products, such as fermented foods and beverages. In this sense, the high demand for fermentation products in recent decades has generated an increase in the production of yeast biomass at an industrial level. In particular, in Paraguay, the number of craft breweries has increased, who mostly import the raw material as dry yeast, due to the facilities that it presents in terms of cost and maintenance. Taking into account this usable gap, it is compared the growth of two brewing yeasts *Saccharomyces cerevisiae* SafAle US-05 used for the manufacture of Ale type beer and *Saccharomyces pastorianus* SafLager S-23 used for the manufacture of Lager type beer in the traditional culture medium YPD and in an alternative culture medium based on clarified cane molasses; The yeast fermentations were ca-

ried out in flasks for a preliminary evaluation of their behavior in the formulation of the medium used. The main result obtained is that the Biomass Level of *S. cerevisiae* in YPD was 16.57 g/L and in the alternative medium it was 12.96 g/L; while in *S. pastorianus* it was 14.22 g/L and 9.37 g/L. The acceptable biomass level indicates that the production of liquid biomass of both brewers' yeasts by fermentation in a molasses-based medium turns out to be a feasible and profitable biotechnological process.

Keywords: *Saccharomyces*, liquid biomass, cane molasses

INTRODUCCIÓN

Desde hace varias décadas los procesos fermentativos son utilizados ampliamente para la obtención de productos de interés como metabolitos, biomasa, fármacos, alimentos, etc. La biotecnología es la encargada de optimizar estos procesos de producción de una forma rentable, es decir con un enfoque en la reducción de costos y aumento rendimiento y productividad (Cardozo y Moreno, 2012; Singh, et al., 2017).

La utilización de subproductos procedentes del sector agroindustrial parece responder a ambas necesidades, ya que aporta a la disminución de posibles contaminantes, disminuye los costos de producción, se encuentran altamente disponibles y al ser una fuente rica en carbohidratos podría aumentar la productividad del proceso (Grande, 2016). La melaza de caña de azúcar es un subproducto de la industria azucarera la cual tiene diversas aplicaciones industriales, debido a su alto porcentaje de carbono orgánico, vitaminas, aminoácidos, etc. (Valencia y Zapata, 2014).

Saccharomyces sp., es la levadura productora de etanol por excelencia, ampliamente utilizada para la elaboración de pan y bebidas alcohólicas. Las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pastorianus* son las más utilizadas en la producción de cerveza, que es una de las bebidas alcohólicas más consumidas a nivel mundial (Ferreira, et al., 2010).

A nivel nacional se produce levadura seca y fresca para la industria panadera, utilizando melaza de caña como fuente de carbono; pero no se produce levadura cervecera, lo que genera la ne-

cesidad de importarlas como casi todos sus insumos para la producción, esto podría ser una brecha aprovechable por profesionales nacionales de las diferentes áreas.

El objetivo de este trabajo es producir biomasa líquida de levaduras cerveceras utilizando un medio alternativo a base de melaza de caña clarificada como fuente de carbono, analizando parámetros estequiométricos y cinéticos del proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Puesta a punto y validación de métodos analíticos de cuantificación

Los siguientes ensayos se aplicaron en los métodos de cuantificación de sustrato en estudio, a fin de demostrar que los mismos cumplen con las características de desempeño adecuadas para su uso (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010).

Ensayo de Linealidad

Se prepararon por triplicado 5 concentraciones independientes de cada estándar con el fin de abarcar el rango lineal de absorbancia del espectrofotómetro.

Ensayo de Precisión

Se prepararon soluciones testigos que fueron analizadas con los respectivos métodos de cuantificación. Para los métodos de cuantificación de glucosa y azúcares reductores se utilizó una solución testigo de glucosa de 1,5 g/L de concentración. Se analizaron 20 réplicas de la solución tes-

tigo en dos días diferentes (10 réplicas por día).

Ensayo de Veracidad

Se prepararon por quintuplicado, soluciones de concentración conocida de glucosa empleando como solvente al medio de cultivo (matriz) a utilizar. Luego se analizaron las soluciones con el método de cuantificación correspondiente aplicando la curva de calibración realizada con el respectivo estándar, a fin de determinar el porcentaje de recuperación de cada analito.

Cuantificación enzimática de glucosa

Para la cuantificación de glucosa se utilizó el reactivo enzimático provisto por el kit comercial de glicemia enzimática de Human. Se realizó una solución stock de 4 g/L de dextrosa anhidra (Anebra, Argentina) a partir de la misma se realizaron diluciones seriadas para obtener 5 puntos de calibración (0,25 g/L; 0,5 g/L; 1 g/L; 2 g/L y 4 g/L). Además, se preparó una solución testigo de glucosa con una concentración de 1,5 g/L; así como también se preparó un blanco correspondiente a la matriz analizada, sin agregado de glucosa, se utilizó agua destilada como blanco de reacción de los estándares y del testigo. Siguiendo las instrucciones del fabricante del kit comercial, en tubos de ensayo de vidrio se colocaron 10 µl de las soluciones preparadas y se agregó 1 mL del reactivo provisto por el kit, luego se homogeneizó. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 10 min, finalmente se midió la absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro.

Cuantificación de azúcares reductores totales

Se prepararon por triplicado 5 concentraciones del estándar a fin de abarcar el rango lineal de absorbancia del espectrofotómetro. Las concentraciones utilizadas para el método de cuantificación de azúcares reductores fueron: 0,25 g/L; 0,5 g/L; 1 g/L; 2 g/L y 4 g/L utilizando como material de referencia glucosa. Asimismo, se preparó una solución testigo de glucosa con una concentra-

ción de 1,5 g/L; se preparó un blanco correspondiente a la matriz analizada, sin azúcares, se utilizó agua destilada como blanco de los estándares y del testigo.

Siguiendo la metodología propuesta por Avila et al. (2012) se realizó la preparación del reactivo de DNS: Se pesó 1 g de 3,5-ácido dinitrosalicílico, 30 g de tartrato de sodio y potasio y 1,6 g de hidróxido de sodio (Merck, Alemania). Se disolvió el hidróxido de sodio en 40 mL de agua destilada y se añadió lentamente el tartrato de sodio y potasio en agitación. Se completó con agua destilada hasta 80 mL y se agregó lentamente el 3,5-ácido dinitrosalicílico. Se dejó en agitación toda la noche, se enrazó a 100 mL y se filtró con papel de filtro cualitativo.

Para el ensayo se mezclaron en tubos de ensayo 0,5 mL de cada solución estándar o muestra y 0,5 mL del reactivo de DNS. Se llevaron los tubos a ebullición en baño con agua durante 5 min y luego se enfriaron en hielo. Se añadieron 5 mL de agua destilada y se dejó reposar por 15 min, finalmente se midió la absorbancia por espectrofotometría a 540 nm.

Medio de cultivo a base de melaza de caña

La melaza de caña de la composición del medio de cultivo alternativo utilizado para el crecimiento de las cepas de levaduras, se obtuvo de manera comercial (COPALSA, Paraguay). La composición del medio de cultivo fue provista por el Dr. Diego Nosedá de la UNSAM y fue la siguiente: 41,4 mL/L de melaza de caña (COPALSA, Paraguay), 8,25 g/L de sulfato de amonio (Merck, Alemania), 2,5 g/L de cloruro de potasio, 0,85 g/L fosfato de monoamónico (Merck, Alemania), 0,3 g/L de sulfato de magnesio, 2,5 mL/L de ácido fosfórico y 1 mL/L de hidróxido de amonio. La preparación del medio consistió en disolver 41,4 mL de melaza de caña en 1 L de agua destilada estéril, posteriormente se clarificó mediante centrifugación a 8000 rpm por 10 min y luego se agregaron las sales mencionadas, pos-

teriormente se esterilizó en autoclave a 121 °C, a 1 atm por 20 min.

Determinación de la relación entre densidad óptica y peso seco de la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus*

Se realizaron curvas de calibración entre la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) y el peso seco de biomasa para las cepas de *S. cerevisiae* y *S. pastorianus*, empleando la misma metodología para ambas levaduras.

Para tal fin, stocks en glicerol de cada cepa se sembraron en placas de Petri con YPD agar (Conda Lab S.A., España) (extracto de levadura 10 g/L, peptona de carne 20 g/L, glucosa 20 g/L, agar-agar 20 g/L) y se incubaron a 30°C por 48 h. A partir de la biomasa crecida en dichas placas se inocularon en matraz Erlenmeyer de 100 ml conteniendo 20 ml de medio complejo YPD (extracto de levadura 10 g/L, peptona de carne 20 g/L, glucosa 20 g/L). Los matraces Erlenmeyer se incubaron en un thermoshaker durante 40 h a 30°C y 200 rpm. A partir de la biomasa de los cultivos líquidos se realizaron diluciones seriadas con agua destilada estéril, a las cuales se les determinó la DO_{600} por espectrofotometría. Asimismo, alícuotas de 5 ml de cada dilución se centrifugaron en una centrifuga Eppendorf HERMLE Z216 a 5000 rpm durante 20 min. Luego, se descartaron los sobrenadantes y los precipitados celulares se llevaron a sequedad total en una estufa FANEM 520 a 60°C hasta peso constante. Se determinó el peso seco de la biomasa expresado en g/L para cada dilución analizada. A partir de estos valores se construyeron las curvas de calibración entre DO_{600} y el peso seco de biomasa (g/L) para ambas levaduras.

Para determinar los valores de peso seco de biomasa en g/L a partir de valores de DO_{600} de cultivos considerando el blanco del medio de cultivo, se emplearon las siguientes ecuaciones:

Ecuación 1 - Biomasa (g/L) de *S. cerevisiae*:

$$\frac{D.O.(600nm)}{1,4272}$$

Ecuación 2 - Biomasa (g/L) de *S. pastorianus*:

$$\frac{D.O.(600nm)}{1,6398}$$

Evaluación del crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* y *S. pastorianus* en medio YPD y en medio a base de melaza de caña

Las cepas de *S. cerevisiae* y *S. pastorianus* en medio YPD y en medio a base de melaza de caña en matraces Erlenmeyer; primeramente, los stocks se utilizaron para sembrar placas de Petri con YPD agar o en medio a base de caña agar las mismas se incubaron a 30 °C por 48 h. La biomasa crecida en ambas placas se inoculó por duplicado en matraces Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 20 mL de medio YPD y los matraces se incubaron a 30 °C y 200 rpm por 48 h en agitador. Posteriormente se determinó la DO_{600} por espectrofotometría.

Estos cultivos fueron utilizados para inocular en una relación 1:10 en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de YPD o en medio a base de caña. Los frascos fueron incubados a 30 °C y 200 rpm en agitador. Se tomaron muestras de los cultivos periódicamente para evaluar su crecimiento por medio de la DO_{600} , para evaluar el consumo de glucosa y azúcares reductores mediante espectrofotometría, así como también para determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de ambas cepas en ambos medios de cultivo. Para el cálculo de los parámetros cinéticos se emplearon las siguientes ecuaciones:

Ecuación 3 - Rendimiento en función de glucosa consumida:

$$Y_{x/s} (g_x/g_s): \frac{X_2 - X_1}{S_2 - S_1}$$

Ecuación 4 - Rendimiento en función de azúcares reductores consumidos:

$$Y_{x/s} (g_x/g_s): \frac{X_2 - X_1}{-(S_2 - S_1)}$$

Ecuación 5- Velocidad específica máxima de crecimiento:

$$\mu_{max} (h^{-1}): \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

Ecuación 6 -Productividad volumétrica máxima:

$$P_{vMax} (g/Lh): \frac{X_{final}}{t_{total}}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Puesta a punto y validación de métodos analíticos de cuantificación

En la Tabla 1 se observa un resumen de los resultados obtenidos para los ensayos de validación de los métodos de cuantificación de glucosa y azúcares reductores.

Los resultados obtenidos indican que las metodologías utilizadas son adecuadas; ya que mostraron una apropiada precisión y veracidad, por lo que son aptas para su aplicación. De este modo, con las metodologías de cuantificación puestas a

punto y validadas, se consiguieron herramientas confiables para el análisis del proceso de producción de biomasa de *S. cerevisiae* y *S. pastorianus*, además se establecieron controles de los resultados aplicando los gráficos de control de valor medio para cada método.

Determinación de la relación entre densidad óptica y peso seco de la biomasa de *S. cerevisiae* y *S. pastorianus*

Se cuantificó el peso de los precipitados secos de *S. cerevisiae* crecido en medio líquido YPD y se graficó la curva de calibración de DO₆₀₀ vs el peso seco de biomasa (g/L). A partir del ajuste lineal de la curva de calibración se obtuvo la ecuación de la recta $y = 1,4272x$ con un R² de 0,9992. De este modo se logró relacionar la densidad óptica celular con el peso seco de biomasa de *S. cerevisiae*.

Del mismo modo, se cuantificó el peso de los precipitados secos de *S. pastorianus* crecido en medio líquido YPD y se graficó la curva de calibración entre DO₆₀₀ y el peso seco de biomasa (g/L). A partir del ajuste lineal de la curva de calibración se obtuvo la ecuación de la recta $y = 1,6398x$ con un R² de 0,9998. De este modo se logró relacionar la densidad óptica celular con el peso seco de biomasa de *S. pastorianus*.

Tabla 1. Resultados de los ensayos de validación y puesta a punto aplicado a las metodologías de cuantificación de glucosa y azúcares reductores, con su respectivo criterio de aceptación

ENSAYO	Cuantificación de Glucosa		Cuantificación de Azúcares reductores	
	Medio YPD	Medio a base de Melaza de caña	Medio YPD	Medio a base de Melaza de caña
Linealidad (R ² ≥ 0,995)	0,9957		0,9995	
Precisión (RSD% < 5 %)	2,87 %		1,78 %	
Veracidad (95 % < % recuperación < 105 %)	100,5 %	99 %	104 %	99 %

Evaluación del crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* y *S. pastorianus* en medio YPD y en medio a base de melaza de caña

El crecimiento de ambas cepas de *Saccharomyces* fue evaluado primeramente en medio de cultivo comercial YPD. En medio comercial YPD *S. cerevisiae* consumió la totalidad de la glucosa y de los azúcares reductores luego de 28 h de incubación. Así, a dicho tiempo se alcanzó un nivel máximo de biomasa de 16,57 g/L; lo que corresponde a un rendimiento de biomasa en función de glucosa consumida ($Y_{x/s}$) de 0,81 gx/gs y un rendimiento de biomasa en función de los azúcares reductores consumidos ($Y_{x/s}$) de 0,67 gx/gs, mientras que *S. pastorianus* consumió la totalidad de glucosa y de los azúcares reductores luego de 32 h de incubación, momento en el cual se alcanzó un nivel máximo de biomasa de 14,22 g/L, lo que corresponde a un rendimiento en base al consumo de glucosa ($Y_{x/s}$) de 0,67 gx/gs, así como también a un rendimiento en función de los azúcares reductores consumidos ($Y_{x/s}$) de 0,52 gx/gs.

En las Figuras 1 y Figura 2, se puede observar que la fase de adaptación ocurre durante las primeras 6 a 7 h en ambos cultivos; en cambio si comparamos la fase exponencial de *S. cerevisiae* de aproximadamente 13 h con la de *S. pastorianus* que tuvo una duración de más de 20 h, así como también podemos observar que se obtuvo 16,57 g/L y 14,22 g/L de biomasa, respectivamente.

Estas dos diferencias son debido a las condiciones de crecimiento, principalmente temperatura (30°C) si bien los rangos de temperaturas óptimos para cada especie de *Saccharomyces* varía desde 20° C hasta 30 °C, *S. pastorianus* es una cepa de fermentación óptima baja. Cardozo y Moreno (2012), describieron el crecimiento de *S. cerevisiae* en medio de cultivo YPD obteniendo la siguiente curva de crecimiento: fase de adaptación durante las 2 primeras h, la fase exponencial desde las 2 h hasta las 8 h de crecimiento y la fase de estacionaria de 8 h a 12 h; los tiempos de duración de cada fase tienen una clara diferencia con los conseguidos en los ensayos; esto es debido al origen de las cepas; la cepa utilizada por Cardozo y Moreno (2012) fue provisto por un laboratorio conservado en 30% de glicerol a -20°C, mientras que las cepas utilizadas en los ensayos son cepas liofilizadas de origen comercial, las cuales fueron rehidratadas, cultivadas y conservadas en el laboratorio antes de su utilización. Las cepas liofilizadas pasan por el proceso de secado lo que implica un aumento en la expresión de los genes implicados en el catabolismo de los ácidos grasos, la gluconeogénesis y el ciclo del glioxilato; a su vez, el proceso de rehidratación de cepas liofilizadas implica mucho estrés celular (estrés oxidativo, estrés osmótico, células dañadas, etc.) (Jenkins, 2011).

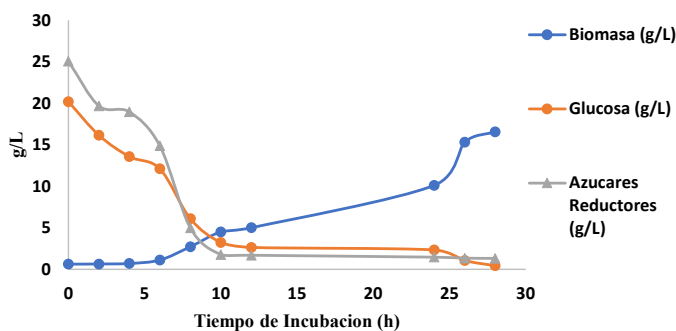


Figura 1. Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD. La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa (g/L), y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores, todas estas en función del tiempo de incubación (h)

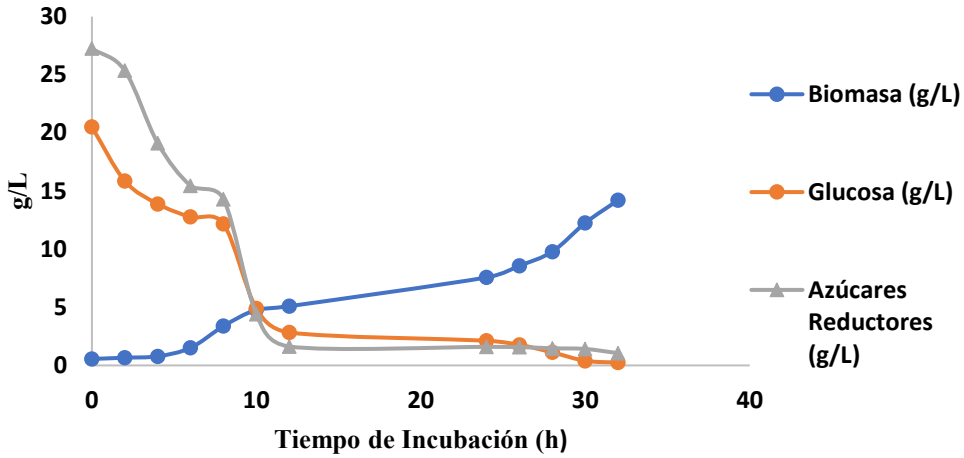


Figura 2. Cultivo de *Saccharomyces pastorianus* en medio YPD. La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa (g/L), y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores, todas estas en función del tiempo de incubación

Los cultivos de *S. cerevisiae* y *S. pastorianus* en el medio alternativo con melaza de caña mostraron que el comportamiento de dichas levaduras fue similar. Como se observa en las Figuras 3 y 4 en las primeras horas de los cultivos de ambas cepas el consumo de glucosa fue casi de su totalidad, mientras que la concentración de azúcares reductores tuvo un descenso importante en las primeras 12 h de cultivo para ambas cepas. Fajardo y Sarmiento (2012), describieron que en las primeras 5 h de cultivo de una cepa de *S. cerevisiae* aislada de la naturaleza en el medio con melaza de caña, la glucosa residual aumentó ligeramente debido a la presencia de la enzima invertasa que es la encargada de hidrolizar la sacarosa produciendo glucosa y fructosa que son más simples y por lo tanto asimilables para el microorganismo. En contrapartida, en los cultivos que se realizaron, se observó una disminución constante de los sustratos con el tiempo, esto podría deberse a que las cepas de levaduras utilizadas a nivel industrial al producirse en medios con una concentración mínima de melaza de caña están adaptadas a los azúcares presentes en la melaza, por

lo tanto, los metabolizan de forma más eficiente. Asimismo, continuando con la comparación del crecimiento entre ambas cepas, se observa que en cuanto a los parámetros rendimiento de biomasa en base al sustrato consumido, nivel máximo de biomasa generada y velocidad específica de crecimiento, la cepa de *S. cerevisiae* es más eficiente que la cepa de *S. pastorianus*. Esto podría deberse a las condiciones óptimas de crecimiento de dicha cepa, como ser la temperatura, ya que la cepa de *S. pastorianus* es más sensible a temperaturas elevadas. Por tal motivo, las fermentaciones para la producción de cerveza tipo lager suelen realizarse a temperaturas entre 5 a 10°C. A su vez si comparamos la biomasa con la obtenida por Cardozo y Moreno (2012) quienes obtuvieron un máximo de 7,340 g/L de biomasa y una productividad de 0,7 g/Lh, podemos observar que la biomasa y productividad de *S. cerevisiae* y *S. pastorianus* en medio alternativo a base de melaza de caña fue de 12,96g/L y 0,28 g/Lh; y 9,37 g/L y 0,93 g/Lh, respectivamente.

Los factores implicados en el crecimiento celular son tanto el tipo de cepa que como ya vi-

mos tienen metabolismos diferentes; así como la concentración de glucosa y azúcares reductores en los tipos de melazas de caña utilizadas, como es bien sabido la melaza es un subproducto de la industria azucarera, por lo cual la concentración final de los azúcares dependen del proceso de producción, la concentración inicial de azúcares contenidos en la caña de azúcar que a la vez depende del tipo de cultivo, suelo, etc. que varía tanto de industria como de país.

En la Tabla 2 se comparan los parámetros de crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* y *S. pastorianus* en medio YPD y en el medio a base de melaza de caña. El crecimiento a nivel Erlenmeyer fue más eficiente en el medio YPD, ya que todos parámetros de crecimiento son más elevados

que en el medio alternativo a base de melaza de caña. Esto es debido a que el medio YPD es más rico nutricionalmente por el contenido de extracto de levadura y peptona de carne. Sin embargo, es importante remarcar que el medio tradicional YPD es sumamente costoso (siendo el costo actualizado en dólares de aproximadamente de 180 \$ un frasco de 500 g) justamente lo que hace que la producción de biomasa líquida de levaduras cerveceras en dicho medio sea muy poco rentable a nivel industrial, mientras que la melaza por kg tiene un costo aproximado de 2 \$, esto podría abrir una brecha de aprovechamiento para las industrias cerveceras artesanales que fueron emergiendo en los últimos años a nivel país.

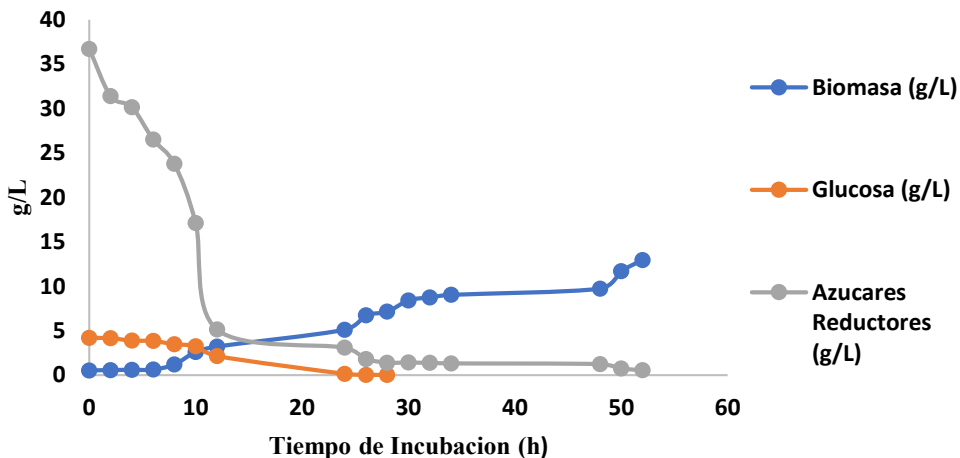


Figura 3. Cultivo de *S. cerevisiae* en medio a base melaza de caña. La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa (g/L), y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores (g/L), en función del tiempo de incubación (h)

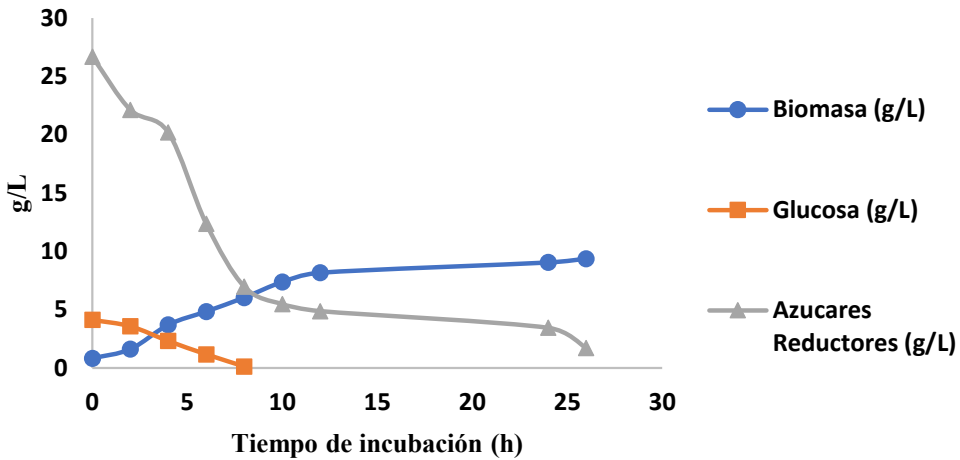


Figura 4. Cultivo de *Saccharomyces pastorianus* en medio de cultivo a base melaza de caña. La línea azul corresponde a la variación de biomasa (peso seco, g/L), la línea naranja corresponde al consumo de glucosa (g/L), y la línea gris corresponde al consumo de azúcares reductores (g/L), todas estas en función del tiempo de incubación (h).

Tabla 2. Comparación de los parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* en medio YPD y medio de cultivo a base de melaza de caña.

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		<i>Saccharomyces pastorianus</i>	
	Medio YPD	Medio con melaza de caña	Medio YPD	Medio con melaza de caña
Rendimiento de Biomasa en base a glucosa consumida ($Y_{x/s}$, g_x/g_s)	0,81	0,65	0,67	0,62
Rendimiento de Biomasa en base a azúcares reductores consumidos ($Y_{x/s}$, g_x/g_s)	0,67	0,34	0,52	0,34
Velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m , h^{-1})	0,35	0,36	0,35	0,12
Nivel Máximo de Biomasa (g/L)	16,57	12,96	14,22	9,37
Productividad volumétrica Máxima (P_{vMax} , g/Lh)	0,64	0,28	0,48	0,93

CONCLUSIONES

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el crecimiento de dos cepas comerciales de interés industrial en un medio económico, en esta etapa se obtuvo biomasa líquida de las le-

vaduras cerveceras *S. cerevisiae* y *S. pastorianus* mediante fermentaciones con el medio de cultivo alternativo a base de melaza de caña en matraces. Cabe remarcar, que para ambas levaduras se consiguieron niveles de biomasa aceptables con el medio alternativo a base de melaza de caña que

con el medio de cultivo tradicional YPD, lo cual podría deberse a factores físicos como la agitación y consecuente distribución del oxígeno y demás nutrientes. Teniendo en cuenta lo mencionado, de igual forma la producción final en medio a base melaza de caña es mucho más económica que el obtenido en medio YPD. Estos resultados permiten indicar que la producción de biomasa líquida de ambas levaduras cerveceras mediante fermentación en medio a base de melaza, resulta ser un proceso biotecnológico factible y rentable. Para futuros trabajos se recomienda escalar el proceso a biorreactor de tanque agitado, realizar conteo de células viales en la biomasa, además de utilizar la biomasa obtenida para inocular mosto cervicero.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – CONACYT por la financiación de la Maestría. A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción FACEN – UNA por desarrollar la Maestría en Biotecnología Industrial.

CONFLICTO DE INTERESES

El autor declara que no existe ningún tipo de conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ávila, R., Rivas, B., Hernández, R., Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease. *Multiciencias*, 12:129-135.

Cardozo, M., Moreno, J. (2012). Diseño y optimización de un medio de cultivo a base de melaza de caña para la producción de biomasa a partir de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de

pregrado Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia, Bogotá. 15-30.

Fajardo, E. y Sarmiento. (2007). Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de pregrado Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia, Bogotá. 22-42.

Ferreira, I., Pinho, O., Vieira, E. y Tavarela, J. (2010). Brewers *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *ELSEVIER*. 11(2): 77-84.

Grande, C. (2016). Valoración biotecnológica de residuos agrícolas y agroindustriales. Cali, Colombia. Editorial Bonaventuriana. 36-42.







Instituto de Salud Pública de Chile. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos.

Jenkins, D. (2011). The impact of dehydration and rehydration on brewing yeast. Tesis PhD. Universidad de Nottingham. 10-30.

Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M. y Tripathi, C. (2017). Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. *Frontiers in Microbiology*. 7:2087.

Valencia, A. y Zapata, C. (2014). Remoción de Calcio y Magnesio de la melaza para el mejoramiento del proceso de Fermentación. Tesis de pregrado Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Trujillo. Perú, Trujillo. 2-18.

Effectiveness of biological, botanical and synthetic products in the control of onion (*Allium cepa*) wilt caused by *Fusarium* sp. Resources for integrated management.

Díaz-Nájera, J. F.¹; Ayvar-Serna, S.¹; Vargas-Hernandez, M.²; Sanabria-Velázquez, A. D.³; Cerezo-Aparicio, C. M.¹; Enciso-Maldonado, G. A.^{3*}

¹Departamento de Fitotecnia, Centro de Estudios Profesionales del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, Cocula, México

²Departamento de Suelos, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México

³Centro de Desarrollo e Innovación Tecnológica, Hohenau, Paraguay

* E-mail del autor: gui77enciso@gmail.com

Efectividad de productos biológicos, botánicos y sintéticos en el control de la marchitez de la cebolla (*Allium cepa*) causada por *Fusarium* sp. Recursos para una gestión integrada. La marchitez de la cebolla puede reducir los rendimientos hasta un 25-30%. A partir de plantas de cebolla con síntomas de marchitez, se obtuvo un aislado monospórico del hongo *Fusarium* spp. y se verificó su patogenicidad. El hongo fue identificado morfológica y molecularmente mediante la región ITS como *Fusarium* sp. Posteriormente, se determinó la susceptibilidad del patógeno a pesticidas biológicos, botánicos y químicos a través de cuatro bioensayos. En el experimento I, se evaluó la antibiosis de *Trichoderma* spp. *in vitro* mediante la técnica del celofán. En los experimentos II y III, se evaluó el efecto *in vitro* de fungicidas botánicos y químicos mediante la técnica de cultivo en agar papa dextrosa modificada (NeemAcar®). En el experimento IV, se seleccionaron los mejores tratamientos de los ensayos *in vitro* para conocer su efecto en invernadero. *Trichoderma virens* (PHC Root Mate®) inhibió el 33,3% del crecimiento micelial del patógeno. El extracto de canela-neem (NeemAcar®) en dosis de 0,06, 0,08 y 0,10 mL L⁻¹ inhibió en un 100% el crecimiento micelial del patógeno. Los fungicidas benomyl, prochloraz y pyraclostrobin suprimieron por completo el desarrollo del patógeno. En condiciones de invernadero, la incidencia de marchitez de las plantas tratadas con *Trichoderma* spp. y los extractos botánicos aplicados individualmente y en combinación no presentaron diferencias significativas con los fungicidas químicos. Estos resultados permitirán desarrollar futuros programas de manejo integrado de enfermedades para la marchitez de la cebolla.

Palabras clave: *Allium cepa* L., *Trichoderma* spp., extractos vegetales, fungicidas químicos

Effectiveness of biological, botanical and synthetic products in the control of onion (*Allium cepa*) wilt caused by *Fusarium* sp. Resources for integrated management. Onion wilt is an endemic disease in farms of horticulture production in Michoacán, Mexico. This disease can reduce yields by up to 25-30%. A monosporic isolate of the fungus *Fusarium* spp. was obtained from onion plants with wilting symptoms, and its pathogenicity was verified. The fungus was morphologically and molecularly identified using the ITS region of reference. Also, *Fusarium* sp. susceptibility to biological,

botanical, and chemical pesticides was assessed through four different bioassays. In experiment I, *Trichoderma* spp. *in vitro* antibiosis was tested using the cellophane technique. In Trials II and III, the *in vitro* effect of botanical and chemical fungicides on the pathogen was evaluated through the amended potato dextrose agar (PDA) culture technique. In Trial IV, the efficacy of the products selected during *in vitro* assays was evaluated under greenhouse conditions. During the antibiosis trials, the commercial strain of *Trichoderma virens* (PHC Root Mate®) inhibited 33.3% of *Fusarium* sp. mycelial growth. Among botanical pesticides, cinnamon-neem extract (NeemAca®) at doses of 0.06, 0.08- and 0.10-mL L⁻¹ inhibited 100% mycelial growth of *Fusarium* sp. The fungicides benomyl, prochloraz, and pyraclostrobin completely suppressed *Fusarium* sp. development. Under greenhouse conditions, the incidence of wilt of plants treated with *Trichoderma* spp. and botanical extracts applied individually and in combination, did not present significant differences from plants treated with chemical fungicides. These results will help to develop an integrated disease management program for onion wilt.

Keywords: *Allium cepa* L., *Trichoderma* spp., plant extracts, chemical fungicides

INTRODUCTION

In Mexico, onions (*Allium cepa* L.) are part of the popular diet and an important vegetable for consumption, produced in more than 49,311 ha with 1,525,501 t harvested in 2018 (Tirado-Ramírez et al., 2019). Nevertheless, the symptoms of bulb and root rot caused by *Fusarium* spp. significantly affect the quality of the product and reduce crop productivity by up to 25-30%. The disease is caused by different species of the genus *Fusarium*, including *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *F. acuminatum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. subglutinans*, *F. tricinctum*, and *F. redolens* (Bayraktar and Dolar, 2011; Haapalainen et al., 2016). The fungus can be spreaded by infected seeds causing wilting of young plants as well as bulb rot during pre and postharvest (Dugan et al., 2019).

The management of bulb and root rot caused by *Fusarium* sp. is based on cultural practices and synthetic pesticides. These management approaches are effective in reducing short-term damage. However, their use increases production costs, and misuse threatens human health and the environment (Ghanbarzadeh et al., 2016). An alternative to the use of these synthetic pesticides is the use of biological control agents (BCA). The species of *Trichoderma* are natural inhabitants in the

soil and rhizosphere, grow fast, and act as BCA of fungal root diseases caused by several genera such as *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotium*, *Macrophomina*, and *Sclerotinia* (Howell, 2003). Furthermore, it promotes the development and natural defense of the host (Yasmeen and Siddiqui, 2017). In several bioassays, the ability of *Trichoderma* species to decrease onion bulb rot by *Fusarium* has been proven to be effective (John et al., 2010). Bulb and foliage treatments with *Trichoderma* decreased the incidence of *Fusarium* spp. wilt and promote plant development (Naguleswaran and Pakeerathan, 2014). An equally promising alternative is the use of botanical extracts against *Fusarium* sp. as these are safer for the environment. Plant extracts contain potent agents against plant pathogenic fungi and are less toxic than synthetic fungicides. The antimicrobial activity of plant extracts has been attributed to many phytochemical components, including coumarins, terpenoids, flavonoids, carotenoids, curcumins, and others (Villa-Martínez et al., 2015).

The aims of this research were (i) to identify the causal agent of the root and bulb rot of onions produced in Michoacán, Mexico, and (ii) to determine the efficacy of biological, botanical, and chemical products applied *in vitro* and under greenhouse conditions.

MATERIALS AND METHODS

Isolation, identification, and pathogenicity of the fungus

The infected bulbs of onions cultivar “Carta Blanca” were collected from the municipality of La Barca, Jalisco, Mexico. Samples were processed, and a monospore isolate of the fungus was obtained and grown in potato-dextrose-agar (PDA) culture medium. The fungus was morphologically characterized using fungal identification keys and examining conidia under a compound microscope (Leslie and Summerell, 2006). Fungal DNA was extracted using a modification of the cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) DNA extraction protocol (Murray and Thompson, 1980). The ITS region was amplified by PCR using the primers ITS4/ITS5 as described by Díaz-Nájera et al. (2017). The amplicons of 700 bp were sequenced at Macrogen Inc. (Seoul, Republic of Korea) for the molecular identification of the fungus using BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The pathogenicity was tested by inoculating 100 mL of spore suspension with a concentration of 8×10^6 UFC mL⁻¹ “in drench” to 20-day-old onion seedlings “Carta Blanca” grown in pots under greenhouse conditions.

Trial I: Efficacy of *Trichoderma* spp. *in vitro* against *Fusarium* sp.

The effect of extracellular metabolites diffused in the medium produced by native (CN) and commercial (CC) strains of *Trichoderma* was tested using the cellophane membrane technique in PDA (Soliman et al., 2016). A completely randomized design with five repetitions was used. The experimental unit was a Petri plate with 20 mL of PDA + metabolites of *Trichoderma* spp. The treatments were: T1 = *T. harzianum* (PHC T22®, Plant Health Care, Mexico City, Mexico), T2 = *T. virens* (PHC RootMate®, Plant HealthCa-

re, Mexico City, Mexico), T3 = *T. fasciculatum* (Fithan®, Nafex, Mexico City, Mexico), T4 = *T. asperellum* (Santa Teresa, Mexico native strain), T5 = *T. asperellum* (Cocula, Mexico native strain), T6 = *T. asperellum* (Chilapa, Mexico native strain), in addition to the T7 = Control (Petri plate inoculated only with *Fusarium* sp.). A five-day-old *Fusarium* sp. strain mycelial plug was placed in the center of the Petri plates. The amended plates were incubated in the laboratory at room temperature (28 ± 2 °C) and 12 hs photoperiod for nine days. The diameter of the fungus colony was measured every 24 hours for nine days, and the percentage of mycelial growth inhibition was calculated (Sanabria-Velazquez, 2020).

Trial II and III: Efficacy of botanical extracts and chemical fungicides

Two tests were carried out. Trial II compared the effect of three commercial botanical extracts in three different doses and one control (10 treatments, Figure 4). In Trial III, eight chemical fungicides were tested (Figure 5). In both trials, PDA culture medium was amended with each treatment (Kumar and Mane, 2017) and the experimental units were completely randomized with five repetitions per treatment. The pathogen was placed in the center of the plates and then incubated at room temperature (30 ± 2 °C) during 12 hs photoperiod. The diameter of the pathogen colony (cm) was measured every 24 hours. Mycelial growth was measured, and the inhibition percentage was calculated (Patil et al., 2014).

Trial IV: Integrated management of *Fusarium* sp. under greenhouse conditions

Thirty-day-old onion plants grown in polystyrene pots (11.5×7.5×16.8 cm) with 750 g of sand + clay mixture (1:1 v/v) were used. Fertilizer amendments, irrigation, and pest management were provided throughout the duration of the experiments. Pure cultures of *Fusarium* sp.

were transferred to Petri plates with PDA and incubated for ten days at room temperature. A suspension of spores was prepared from the pure cultures of *Fusarium* sp. with a concentration of (4.6×10^6 UFC). The strains of *T. virens* and *T. harzianum* were grown in PDA, and suspensions of 5×10^6 and 5.6×10^6 UFC mL⁻¹ were prepared, respectively. The most effective treatments against *Fusarium* sp. from the previous trials were selected (Figure 6). For the inoculation of *Fusarium* sp., 60 mL pot⁻¹ of the fungus inoculum suspension (4.6×10^6 UFC mL⁻¹) was applied “in drench” to the base of the plant 30 days after transplanting.

For the application of treatments, organic and chemical products, alone or in the mixture, were dissolved in 30 mL of sterile distilled water and applied to the base of the plant 30 days after transplanting. The treatments *T. virens* and *T. harzianum* were applied with concentrations of 5×10^6 and 5.6×10^6 UFC mL⁻¹, respectively. A completely randomized design with ten repetitions was used. Each experimental unit was a pot with a plant totalizing 300 plants in total.

Disease incidence was evaluated when 100% of control treatment plants had visible symptoms of the disease ten days after inoculation. A binomial scale was used in which healthy plants were assigned a value of 0 (zero), and a value of 1 (one) to plants with symptoms of yellowing and wilting (disease plants).

Data analysis

For all studies, normality of distributions was checked before analysis, and data were transformed using the arcsine square root if appropriate. The analysis of variance was performed with Statistics Analysis System (SAS) version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Tukey’s significance test with a family-wise error rate of 5% was used for the comparison of means.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification and pathogenicity characterization of *Fusarium* sp.

The fungal isolate obtained from infected onion bulbs was identified as *Fusarium* sp. with cotton white, hyaline mycelium, which over time turned to purple (Figure 1), having an average daily growth of 0.93 cm under 28 °C. The isolate produced abundant microconidia, showing one to two cells, and usually occurring in short chains and with false heads. Macroconidia were also seen consisting of three to five cells, gradually thin and hunched towards both ends (Figure 1). The products obtained by PCR from the ITS region were 544 pairs of bases and the sequences deposited with accession number KX757772.1 in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Our sequence showed 100% concordance with *F. proliferatum* accessions MN481208.1, MN481207.1, MN481206.1, MN481205.1, MN481204.1, MN481203.1, and MN461565.1 available in the database using BLAST. These BLAST results confirmed the findings of the morphological characterization.

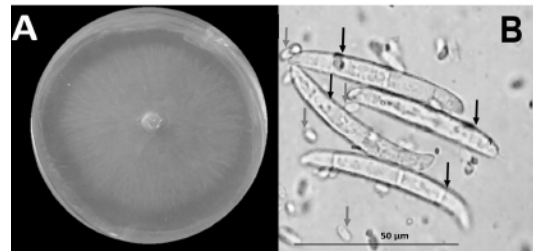


Figure 1. Morphological characterization of *Fusarium* sp. (A) Colony of *Fusarium* sp. on PDA medium. (B) Microconidia (grey arrows) and macroconidia (black arrows).

The isolate of *Fusarium* sp. was catalogued as pathogenic after fulfilling Koch’s postulates.

Symptoms of yellowing, withering of the leaves, and root infection were observed when the pathogen was inoculated in healthy onion plants. Ten days after the inoculation of the monoconidial isolate of *Fusarium* sp., reduction in growth, yellowing, descending leaf death, root rot, and necrosis were observed on inoculated samples, while control plants remained healthy (Figure 2). In the USA, onion wilt caused by *F. proliferatum* has been reported to affect both young and adult onion plants causing rot of the base and the bulb (Dugan et al., 2019). The disease is typically attributed to *F. oxysporum* f. sp. *cepae* (Swift et al., 2002). However, rot of the onion bulb is most often caused by *F. proliferatum* which can be responsible for losses of up to 20% in the field and storage (du-Toit et al., 2003). In this work, we only confirmed that the pathogen belongs to the genus *Fusarium* because, for the identification of *Fusarium* at the species level, it is necessary to use molecular sequencing of multiple genes such as the ITS (internal transcribed spacer), EF1 α (elongation factor) genes. 1 alpha), RPB1 (largest subunit of RNA polymerase) and RPB2 (second largest subunit of RNA polymerase) (MYCOBANK Database, <https://fusarium.mycobank.org/>), actions that

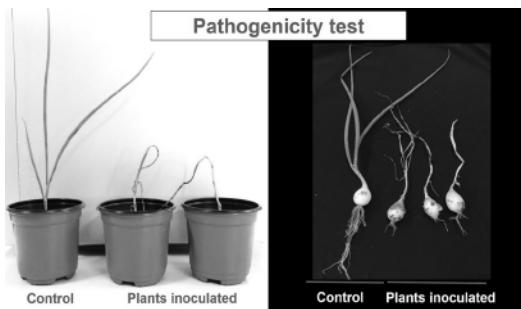


Figure 2. *Fusarium* sp. pathogenicity test in 30-day-old onion plants cultivar “Carta Blanca.” Control plant (left) and inoculated plants (right). Antibiosis *Trichoderma* spp. against *Fusarium* sp.

were not possible during this experimentation. The identification of fungal pathogens to species level is necessary as different species may differ in their biology, which ultimately, may have an effect the management of the disease (Bhunjun et al., 2021). Therefore, more work focusing on the characterization of the pathogen is still needed.

Antibiosis of *Trichoderma* spp. *in vitro* against *Fusarium* sp.

The inhibition of *Fusarium* sp. colonies due to the antibiosis exerted by extracellular metabolites of *Trichoderma* spp. after 48 hours of incubation was statistically significant ($P < 0.0001$). After nine days of incubation, the inhibition of *Fusarium* sp. was higher in treatments with *T. virens* (PHC RootMate[®]) and *T. harzianum* (PHC T22[®]) with values of 33.3 and 29.8%, respectively. Mexican native isolates of *Trichoderma* inhibited the mycelial growth of *Fusarium* sp. up to 21.4%, and they were not statically different from the commercial *Trichoderma* isolates (Figure 3). Similarly, Ayvar-Serna et al. (2021) and Quiroz et al. (2008) reported that two Mexican native strains of *Trichoderma* sp. inhibited 100% of the mycelial growth of *Fusarium* sp. isolated from tomato and garlic. In bioassays made with species other than *Fusarium* sp., Suárez et al. (2008) found that *T. harzianum* inhibited up to 50% of radial growth of *Fusarium solani* isolated from papaya. It is well documented that the antibiosis that the genus *Trichoderma* exerts on phytopathogenic fungi is due to the ability to produce hydrolytic enzymes, including cellulases, chitinases, and glucanases (Cubilla-Rios et al., 2019). These results *in vitro* confirm the antagonistic potential of the strains to compete for space and nutrition in the substrate and inhibit the growth of pathogenic *Fusarium* sp.

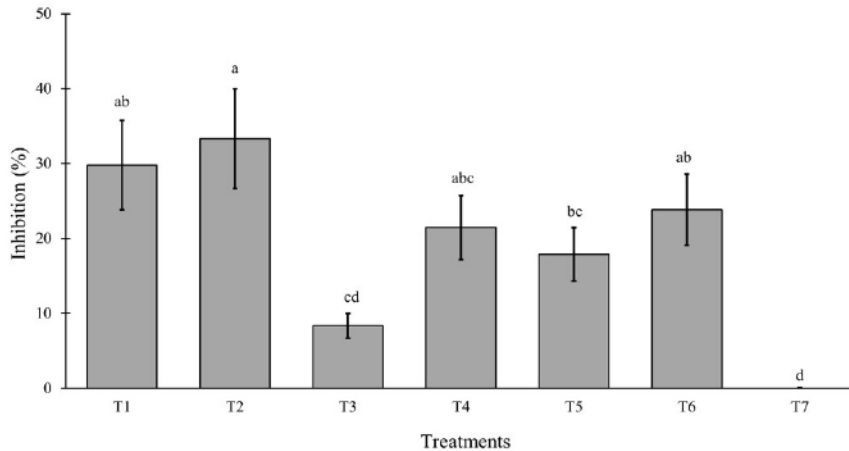


Figure 3. Mycelial inhibition of *Fusarium* sp. grown on PDA medium amended with secondary metabolites of *Trichoderma* spp. The mean values with the same letter are not statistically different (Tukey 0.05). The treatments were: T1 = *Trichoderma harzianum* (PHC T22[®], Plant Health Care, Mexico City, Mexico), T2 = *T. virens* (PHC RootMate[®], Plant HealthCare, Mexico City, Mexico), T3 = *T. fasciculatum* (Fithan[®], Nafex, Mexico City, Mexico), T4 = *T. asperellum* (Santa Teresa, Mexico native strain), T5 = *T. asperellum* (Cocula, Mexico native strain), T6 = *T. asperellum* (Chilapa, Mexico native strain), and the T7 = Control

Effect of botanical extracts against *Fusarium* sp.

Botanical extract treatments significantly inhibited *Fusarium* sp. mycelial growth ($P < 0.0001$). We observed that *Azadirachta extract indica* + *Cinnamomum zeylanicum* (NeemAcar[®]) inhibited 100% mycelial growth of the pathogen

on amended PDA after 17 days of incubation regardless of the dose. The extracts of Regalia Maxx[®] (*Reynoutria sachalinensis*) and Bio-Canela[®] (Oils of *Cinnamomum verum*, *Cassia graveolens*, *Lippia berlandieri*, and *Ricinus communis* + *Allium* spp.) were less effective inhibiting

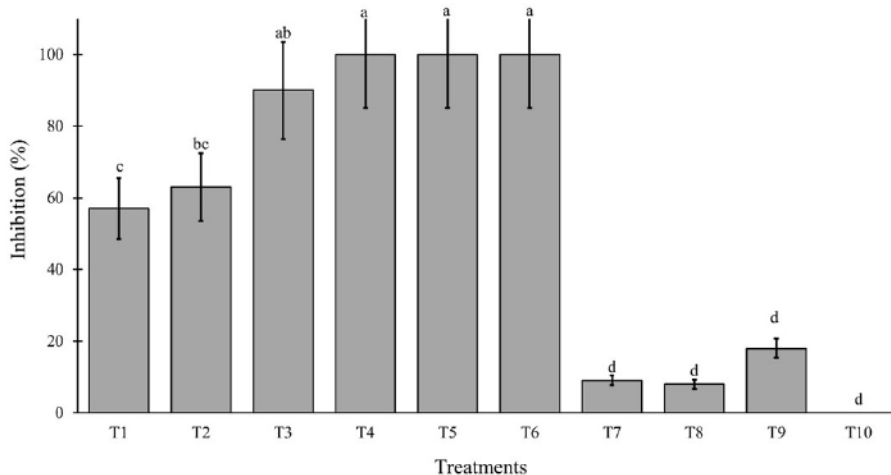


Figure 4. Mycelial inhibition of *Fusarium* sp., after 17 days of incubation in PDA amended with botanical extracts. Mean values with the same letters above the bar are not statistically different (Tukey $\alpha = 0.05$). The treatments were: T1 = Regalia Maxx[®] 0.02 mL, T2 = Regalia Maxx[®] 0.03 mL, T3 = Regalia Maxx[®] 0.04 mL, T4 = NeemAcar[®] 0.06 mL, T5 = NeemAcar[®] 0.08 mL, T6 = NeemAcar[®] 0.1 mL, T7 = Bio-Canela[®] 0.02 mL, T8 = Bio-Canela[®] 0.04 mL, T9 = Bio-Canela[®] 0.06 mL, T10 = Control

the mycelial growth of *Fusarium* sp. except for T3 = Regalia Maxx® 0.04 mL (Figure 4). Various phytochemicals, such as flavonoids, phenols, terpenes, essential oils, alkaloids, lecithin, and polypeptides, have shown antifungal effects (Chouhan et al., 2017). The efficacy of 100% obtained with *Azadirachta indica* (NeemAcar®) in the present experiment is greater than 50% obtained by Díaz-Nájera et al. (2017), with this extract applied in vitro against *F. oxysporum* f. sp. *cepae*.

Effect of chemical pesticides against *Fusarium* sp.

Treatments with benomyl (Promyl®), prochloraz (Sportak®), and pyraclostrobin (Headline®) inhibited the growth of the pathogen by 100% after 12 days of incubation on amended PDA. The fungicides iprodione (Rovral®), methyl thiophanate (Cercobin®), quintozene (Pentaclor®), cyprodinil + fludioxonil (Switch®), and azoxystrobin + difenoconazole (Amistar®), reduced the growth of the pathogen colonies by 71,

76, 68, 69 and 45%, respectively (Figure 5). These results may suggest that *Fusarium* sp. started to develop some resistance to these fungicides, explaining the differential sensitivity to these products. The fungicides benomyl (Promyl®), prochloraz (Sportak®), and pyraclostrobin (Headline®) can be rotated in an integrated management program for onion wilt because their active ingredients have different modes of action. While benomyl interferes with cell division and intracellular transport (Fishel and Dewdney, 2012), pyraclostrobin prevents the germination of spores and the formation of appressoria, and Prochloraz interrupts the synthesis of ergosterol in the membrane. Programs implementing the fungicide prochloraz (Mirage® 50 WP) for seed treatment and bulb immersion against basal rot in onions caused by *F. oxysporum* f. sp. *cepae* reported lower disease incidence and higher yield (Sintayehu et al., 2011).

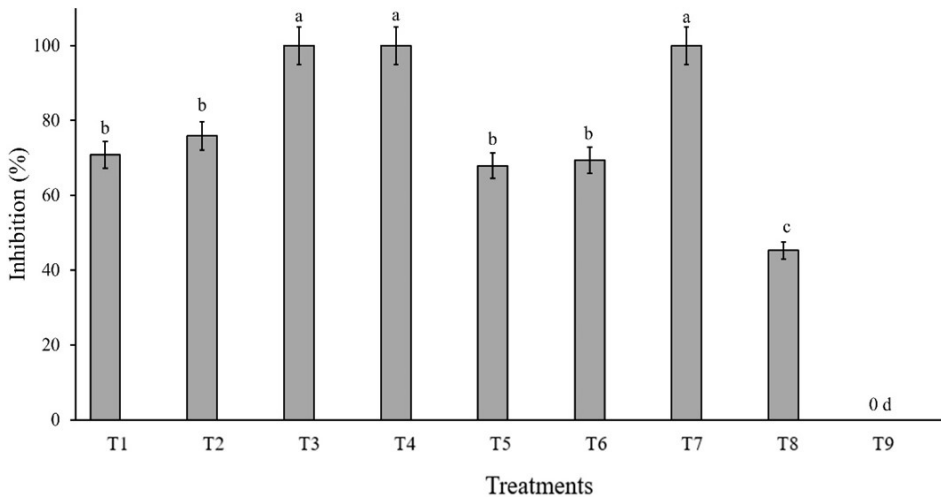


Figure 5. Percentages of inhibition of the growth of *Fusarium* sp. after 12 days of incubation in PDA medium amended with chemical fungicides. The mean values with the same letter above the bar are not statistically different (Tukey $\alpha = 0.05$). The treatments were: T1 = Iprodione (Rovral®), T2 = Thiophanate methyl (Cercobin®), T3 = Benomyl (Promyl®), T4 = Prochloraz (Sportak®), T5 = Quintozenone (Pentaclor®), T6 = Cyprodinil + Fludioxonil (Switch®), T7 = Pyraclostrobin (Headline®), T8 = (Azoxystrobin + Difenoconazole) Amistar®, T9 = Control

Integrated management of *Fusarium* sp. in greenhouse conditions

Onion plants treated with *Trichoderma* (PHC RootMate® and PHC T22®) were highly effective in controlling the disease in greenhouse conditions. However, there were no significant differences among biological, botanical, and chemical treatments, with disease incidence ranging from 0 to 20%. Nevertheless, all treatments were significantly effective compared to the control treatment with 100% incidence (Figure 6). The greenhouse experiment results are supported by our *in vitro* assays, in which *Trichoderma* showed antibiosis as one of the mechanisms to antagonize *Fusarium* sp. Furthermore, it has also

been reported that *Trichoderma* spp., combined with other chemical fungicides can improve the control of *Fusarium* sp. (Omar et al., 2006). In this research, neem (*Azadirachta indica*) extract was highly effective and can be recommended as a preventive treatment for this disease. Aqueous extracts of neem and willow (*Salix babylonica*) had been used successfully in another integrated management program for *Fusarium wilt* (Hanaa et al., 2011). The combination with fungicides was equally successful in reducing the disease incidence, suggesting that rotation of different active ingredients can be proposed to growers to manage onion wilt.

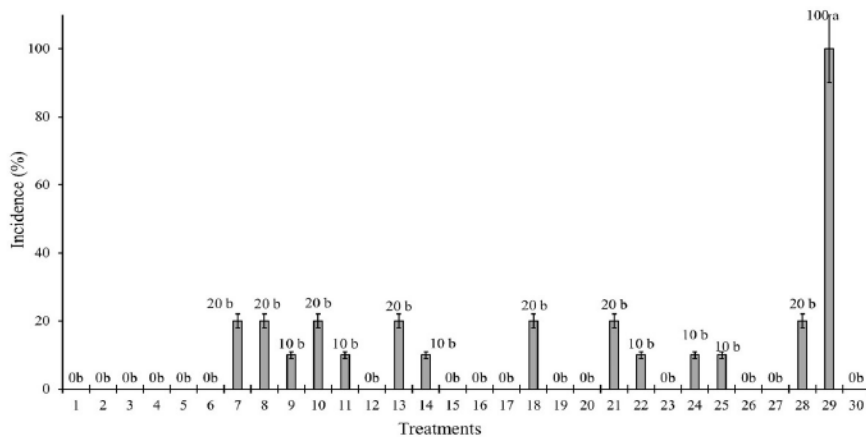


Figure 6. Disease incidence of onion wilt caused by *Fusarium* sp. in greenhouse conditions integrating biological, organic, and chemical products. The treatments were: T1 = PHC T22® (5.6-106 UFC mL⁻¹), T2 = PHC RootMate® (5-106 UFC mL), T3 = PHC T22® + Cercobin® DB (5.6-106 UFC mL⁻¹ + 0.008 g), T4 = PHC RootMate® + Cercobin® DB (5-106 UFC mL + 0.008 g), T5 = PHC® (T22) + Cercobin® DA (5.6-106 UFC mL⁻¹ + 0.011 g), T6 = PHC RootMate® + Cercobin® DA (5-106 UFC mL + 0.011 g), T7 = NeemAcar® DB (0.045mL), T8 = NeemAcar® DM (0.06 mL), T9 = NeemAcar® DA (0.062 mL), T10 = Regalia Maxx® (0.03 mL), T11 = Regalia Maxx® + NeemAcar® DB (0.03 mL + 0.045 mL), T12 = Regalia Maxx® + NeemAcar® DA (0.03 mL + 0.062 mL), T13 = Promyl® DB (0.006 mL), T14 = Promyl® DA (0.0075 mL), T15 = Sportak® DB (0.015 mL), T16 = Sportak® DA (0.0225 mL), T17 = Headline® DB (0.015 mL), T18 = Headline® DA (0.045 mL), T19 = Cercobin® DB (0.008 g), T20 = Cercobin® DA (0.011 g), T21 = NeemAcar® DB + Promyl® DB (0.045 mL + 0.006 mL), T22 = NeemAcar® DB + Promyl® DA (0.045 mL + 0.0075 mL), T23 = NeemAcar® DB + Sportak® DB (0.045 mL + 0.015 mL), T24 = NeemAcar® DA + Cercobin® DB (0.062 mL + 0.008 g), T25 = Regalia Maxx® + Promyl® DA (0.03 mL + 0.0075 mL), T26 = Regalia Maxx® + Sportak® DA (0.03 mL + 0.0225 mL), T27 = Regalia Maxx® + Headline® DA (0.03 mL + 0.045 mL), T28 = Regalia® + Cercobin® DA (0.03 mL + 0.011 g), T29 = Control (inoculated with *Fusarium* sp. and non-treated), T30 = Absolute control. *DB: low dose, DM: medium dose. DA: high dose. Commercial dose recommended by the manufacturer of each product was used.

CONCLUSIONS

In conclusion, we verified by morphological and molecular identification that *Fusarium* sp. was the causal agent of wilting and root rot of onion. This isolate reproduced root infection symptoms when inoculated in healthy onion plants in the variety “Carta Blanca.” The commercial strains of *T. harzianum* (PHC T22[®]), *T. vires* (PHC RootMate[®]), *T. fasciculatum* (Fithan[®]), and the Mexican native strains of *T. asperellum* exhibited antagonistic activity on the mycelial growth of the pathogen. The botanical extract of *A. indica* + *C. zeylanicum* had a 100% inhibitory effect on the pathogen growth regardless of the dose used. The chemical fungicides benomyl, procloraz, and pyraclostrobin were 100% effective in inhibiting the mycelial growth of *Fusarium* sp. The incidence of onion wilt caused by *Fusarium* sp. was significantly reduced by biological, organic, and chemical products applied individually and in combination in greenhouse conditions. To conclude, in the conditions specified on this research, the results indicates that an effective control of the fungus *Fusarium* sp. can be accounted by the biological, botanical and synthetic products assessed in this trial. The variety of products used in this research can be taken into account for a rotational scheme of application at the time of controlling this disease.

JFDN and SAS conceptualized the general research objectives and were responsible for supervision for the planning and execution of the research activity. MVH developed the methodology design and verified the overall reproducibility of results and experiments. ADSV applied statistical, mathematical, and computational techniques to analyze the study. CMCA carried out the experiments and data collection. GAEM prepared the original draft of the published work.

All authors have approved the submission of this manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JFDN and SAS conceptualized the general research objectives and were responsible for supervision for the planning and execution of the research activity. MVH developed the methodology design and verified the overall reproducibility of results and experiments. ADSV applied statistical, mathematical, and computational techniques to analyze the study. CMCA carried out the experiments and data collection. GAEM prepared the original draft of the published work. All authors have approved the submission of this manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest. The authors do not endorse any products, services, or companies mentioned in this paper. Commercial names are provided just to ensure reproducibility of the methods and results reported in this paper.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Ayvar-Serna, S., Díaz-Nájera, J. F., Vargas-Hernández, M., Enciso-Maldonado, G. A., Alvarado-Gómez, O. G., y Ortiz-Martínez, A. I. (2021). Actividad antifúngica de pesticidas biológicos, botánicos y químicos sobre el agente causal de la marchitez vascular del jitomate. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 44(4), 617-617. <https://revfitotecnia.mx/index.php/RFM/article/view/896/852>
- Bayraktar, H. & Dolar, F. S. (2011). Molecular identification and genetic diversity of *Fusa-*

- rium* species associated with onion fields in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 159(1): 28-34.
- Bhunjun, C.S., Phillips, A.J., Jayawardena, R.S., Promputtha, I. & Hyde, K.D. (2021). Importance of molecular data to identify fungal plant pathogens and guidelines for pathogenicity testing based on Koch's Postulates. *Pathogens*, 10(9), p.1096.
- Chouhan, S., Sharma, K. & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3): 58.
- Cubilla-Ríos, A. A., Ruíz-Díaz-Mendoza, D. D., Romero-Rodríguez, M. C., Flores-Giubi, M. E. & Barúa-Chamorro, J. E. (2019). Antibiosis of proteins and metabolites of three species of *Trichoderma* against paraguayana isolates of *Macrophomina phaseolina*. *Agro-nomía Mesoamericana*, 30(1): 63-77.
- Díaz-Nájera, J. F., Ayvar-Serna, S., Vargas-Hernández, M., Damián-Flores, M., Alvarado-Gómez, O. G, Mena-Bahena, A. & Acosta-Ramos, M. (2017). Identification and *in vitro* control of the causal agent of wilt in onion. *Pakistan Journal of Agricultural Science*, 54(3): 497-502.
- Dugan, F. M., Lupien, S. L., & Hellier, B. C. (2019). Infection by *Fusarium proliferatum* in aerial garlic bulbils is strongly reduced compared to rates in seed cloves when both originate from infected bulbs. *Crop Protection*, 116, 43-48.
- du-Toit, L. D., Inglis, D. A. & Pelter, G. Q. (2003). *Fusarium proliferatum* pathogenic on onion bulbs in Washington. *Plant Disease*, 87(6): 750-750.
- Fishel, F. M. & Dewdney, M. M. (2012). Fungicide Resistance Action Committees (FRAC) Classification scheme of fungicides according to mode of action. PI94. University of Florida. 7 p. <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/PI/PI13100.pdf>
- Ghanbarzadeh, B., Safaie, N., Goltapeh, E. M., Danesh, Y. R. & Khelghatibana, F. (2016). Biological control of *Fusarium* basal rot of onion using *Trichoderma harzianum* and *Glomus mosseae*. *Journal of Crop Protection*, 5(3): 359-368.
- Hanaa, R. F., Abdou, Z. A., Salama, D. A., Ibrahim, M. A. & Srour, H. A. M. (2011). Effect of neem and willow aqueous extracts on *Fusarium* wilt disease in tomato seedlings: Induction of antioxidant defensive enzymes. *Annals of Agricultural Sciences*, 56(1): 17.
- Haapalainen, M., Latvala, S., Kuivainen, E., Qiu, Y., Segerstedt, M. & Hannukkala, A. O. (2016). *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. redolens* associated with basal rot of onion in Finland. *Plant Pathology*, 65(8): 1310–1320.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 87(1): 4-10. doi: 10.1094/PDIS.2003.87.1.4
- John, R. P., Tyagi, R., Prévost, D., Brar, S. K., Pouleur, S. & Surampalli, R. (2010). Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Protection*, 29(12): 1452-1459.
- Kumar, P. & Mane, S. S. 2017. Studies on the compatibility of biocontrol agents with certain fungicides. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(3): 1639-1644.
- Leslie, J. F. & Sumerell, B. A. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. Iowa, USA. pp: 80-110. 388 p.
- Murray, M. G. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, 8(19): 4321-4326.

- Naguleswaran, V. & Pakeerathan, K. (2014). Biological control: A promising tool for bulb-rot and leaf twisting fungal diseases in red onion (*Allium cepa* L.). Jaffna District. *World Applied Sciences Journal*, 31(6):1090-1095.
- Omar, I., O'Neill, T. M. & Rossall, S. (2006). Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim. *Plant Pathology*, 55(1): 92-99.
- Patil, N. N., Waghmode, M. S., Gaikwad, P. S., Gajbhiye, M. H., Gunjal, A. B., Nawani, N. & Kapadnis, B. P. (2014). Potential of *Microbispora* sp. V2 as biocontrol agent against *Sclerotium rolfsii*, the causative agent of southern blight of *Zea mays* L. (Baby corn) *in vitro* studies. *Indian Journal of Experimental Biology*, 52(1): 1147-1151.
- Quiroz-Sarmiento, V. F., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A. & Lara-Hernández, M. E. (2008). Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. *Revista Mexicana de Micología*, 26, 27-34.
- Sanabria-Velázquez, A. D. (2020). Evaluación de aislados de *Trichoderma* spp. nativos del Paraguay para el control de *Colletotrichum* spp. causante de la antracnosis en frutilla. *Investigación Agraria*, 22(1): 53-62.
- Sintayehu, A., Sakhuja, P. K., Fininsa, C. & Ahmed, S. (2011). Management of *Fusarium* basal rot (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*) on shallot through fungicidal bulb treatment. *Crop Protection*, 30(5), 560–565.
- Soliman, H. M., Abdel-Fattah, G. & Metwally, E. (2016). Antagonistic interactions between the foliar pathogen *Botrytis fabae* Sard. and *Trichoderma harzianum* Rifai. *Asian Journal of Plant Pathology*, 10(3): 21-28.
- Suárez, M. C. L., Fernández, B. R. J. & Osvaldo, V. N. (2008). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología* 2: 35-43.
- Swift, C. E., Wickliffe, E. R. & Schwartz, H. F. (2002). Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* from onion in Colorado. *Plant Disease*, 86(6): 606-610.
- Tirado-Ramírez, M. A., López-Orona, C. A., Díaz-Valdés, T., Velarde-Félix, S., Martínez-Campos, A. R., Romero-Gómez, S. J. & Retes-Manjarrez, J. E. (2019). First Report of Basal Rot of Onion Caused by *Fusarium brachygibbosum* in Sinaloa, Mexico. *Plant Disease*, 103(3): 582-582.
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parrá, J. M. y Martínez-Escudero, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2):194 – 205.
- Yasmeen, R. & Siddiqui, Z. (2017). Physiological responses of crop plants against *Trichoderma harzianum* in saline environment. *Acta Botanica Croatica*, 76(2): 154–162.

Directrices para autores/as

La guía para los autores es una normativa que se ajusta periódicamente de acuerdo a los requerimientos de los estándares nacionales e internacionales. Los aspectos no definidos, serán resueltos por el Comité editorial de la revista.

Steviana publica investigaciones originales (artículos), revisiones (reviews), notas cortas, libros y material suplementario, en español o inglés. Es responsabilidad total de los autores el contenido científico, gramatical y ortográfico de un artículo. Para someter sus artículos los autores deberán considerar las pautas mencionadas en “Indicaciones para los autores”.

Características de cada tipo de publicación

Un artículo original/inédito, es un tipo de artículo científico que describe de manera completa los datos de una investigación y debe contar con las secciones: **Título, Resumen, Palabras clave, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Aportes de los Investigadores, Referencias Bibliográficas**. Se recomienda que los artículos originales no sobrepasen las 30 páginas, en el caso que supere, el autor deberá comunicarse con el editor.

Una nota breve-corta, es un tipo de artículo que contiene información resultados preliminares de un estudio, informes breves de resultados de una investigación original. **Este tipo de artículo sigue las normas de presentación de un artículo original**. La extensión máxima es de 5 páginas.

Un artículo de revisión (review), es un tipo de artículo que recopila o proporciona información amplia y relevante de un tema específico, sus perspectivas actuales y futuras. **Este tipo de artículo seguirá las normas de presentación de un artículo original, sustituyendo sin embargo metodología, resultados y discusión, por el Desarrollo comentado de la revisión, sin alterar las demás partes**. La extensión máxima es de 10 páginas.

Un suplemento, contiene información relevante para el avance del conocimiento científico. Se publicarán memorias de congresos, jornadas, libros y otros materiales científicos en el área de Recursos Vegetales y afines, como un número suplementario.

Un artículo de divulgación, es un tipo de artículo que utiliza un lenguaje sencillo para el lector no especializado, con un contenido que es producto de proyectos de investigación, orientado a un público más general, con la finalidad de comunicar resultados y posibilitando el acceso de todos los miembros de la sociedad al conocimiento científico. Este tipo de artículo debe contar con las siguientes secciones: **Título, Introducción, Desarrollo, Conclusiones, Referencia bibliográfica**. La extensión máxima es de 3 páginas.

Los artículos son revisados por pares e incluyen fechas de recepción y aceptación.

Indicaciones para la preparación del artículo

En el caso de artículos sometidos en lengua inglesa, los autores deben asegurarse de que el contenido haya pasado por una revisión lingüística adecuada antes de su envío. Los artículos podrán ser rechazados antes de la revisión por pares en el caso que no cumplan con este requisito.

Título principal

Deberá estar escrito en Times New Roman 14, negrita y extensión máxima de 20 palabras. La letra inicial en mayúscula, el resto en minúsculas. El nombre de géneros y especies en cursiva, sin embargo, las abreviaturas como sp. var., comb., s.l., f., subsp., ex, permanecerán con estilo normal. Ejemplo: *Stevia*, *Stevia sp.*, *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni

Autores

Los nombres de los autores se escriben con letra Times New Roman, tamaño 10, por debajo del título, mencionando apellido(s) e inicial del nombre. Indicar en un siguiente párrafo la filiación sin abreviaturas, Ciudad y País. Es obligatorio colocar un superíndice al final de la inicial del nombre del autor y al inicio de la filiación. En un siguiente párrafo se menciona el autor por correspondencia colocando un apartado denominado E-mail. Ejemplo:

Diversidad florística en pastizales de la Reserva para Parque Nacional San Rafael, Paraguay

Benítez, B.^{1*}; Vera, M.¹; Vogt, C.¹; Pereira, C.¹; Rivarola, A.¹

¹Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Laboratorio de Recursos Vegetales. Campus Universitario, San Lorenzo, Paraguay

*E-mail: bbenbert@facen.una.py

Los datos del autor y coautores deberán cargarse en el OJS siguiendo la guía para someter artículos al OJS

Se deberá mencionar el identificador digital del ORCID de al menos el autor principal, para una mejor divulgación de su trabajo.

Se aceptará un solo autor por correspondencia que podrá o no ser el autor principal.

Resumen

Deberá estar en español en letra Arial 9, con extensión máxima de 250 palabras, con el título principal y sin referencias. El resumen deberá incluir información sobre el contenido del artículo siguiendo el orden: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones; sin mencionar estos títulos.

El mismo contenido del resumen en español deberá ser presentado en inglés y con el nombre de Abstract.

Palabras clave

Deberán presentarse en orden alfabético, en minúscula (a menos que sea nombre propio), separadas por coma y sin punto final, con un mínimo de tres (3) y un máximo de cinco (5). No deberá incluir palabras que formen parte del título.

Contenido

Todos los textos deberán conservar el siguiente orden: Título, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Agradecimientos (en caso aplicable), Referencias Bibliográficas. Anexos. Tipo de letra Times New Roman 11, normal, espacio simple. En casos aplicables, el resultado y la discusión pueden ir juntos.

Dentro del texto general serán admitidos un título principal y un título secundario, con tipo de fuente "normal" y sin punto final. El título principal escrito en mayúsculas y negritas (**INTRODUCCIÓN, MATERIALES Y MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSIÓN, CONCLUSIONES, AGRADECIMIENTOS, APORTES DE LOS INVESTIGADORES, REFERENCIAS BIBLIO-**

● ● ●

GRÁFICAS), el título secundario en negritas, con la letra inicial en mayúscula, el resto en minúsculas. Se permitirá el uso de cursiva, negritas, o el subrayado en palabras que quieran resaltarse dentro del artículo, según criterios del autor.

Cuando el caso lo requiera, las abreviaciones deben ser definidas en el texto o leyendas en su primera utilización y deben ser usadas exclusivamente desde ese momento. Para el caso de los nombres científicos deberá escribirse el nombre completo en cursiva seguido de los autores en su primera utilización. Ejemplo: *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni

Tratamientos taxonómicos

Para las citas bibliográficas de los taxones y sinonimias se realizará según la base de datos www.ipni.org, www.tropicos.org

El nombre de géneros y especies en cursiva, sin embargo, las abreviaturas como sp. var., comb., s.l., f., subsp., ex, permanecerán con estilo normal. Ejemplo: *Stevia*, *Stevia sp.*, *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni

Para el caso de descripciones de especímenes, las medidas de largo x ancho se realizará de la siguiente manera: 10-15 x 0,7-1 cm o 10-15 x 0,7-1 mm (se debe mantener la unidad en ambas medidas, sin punto final).

Los códigos de los herbarios se utilizan de acuerdo con [Index Herbariorum](#)

Las ilustraciones, gráficos, fotografías y mapas, serán consideradas “Figuras”. Deberán ajustarse al tamaño de las columnas de la revista (19,5cm x 6,25cm) o al margen de la página (24cm x 18cm). Las mismas deberán formar parte del cuerpo del texto general y también deberán ser enviadas por separado, en formato TIFF o JPG, para su publicación definitiva, con resolución mínima de 300dpi para ilustraciones, gráficos y fotografías, y de 600 dpi para mapas. Los **mapas** deberán presentarse dentro de un recuadro, el norte deberá estar orientado en el margen superior y estar de acuerdo estrictamente con lo que menciona el texto, se incluirán como mínimo dos marcas de longitud y dos de latitud y la escala deberá estar en kilómetros. Deberá remitirse en blanco y negro, pudiendo presentar colores en los casos que sean estrictamente necesarios. Todas las figuras deben estar referenciadas en el texto del artículo. **La leyenda de la figura** se escribe con letra Times New Roman, negritas, tamaño 10 por debajo y sin punto final.

Fotografías, gráficos o dibujos no deberán llevar bordes, ni estar señalizadas. Se permitirán en las figuras solo las señalizaciones de estructuras y/o detalles, con sus unidades de medida, con letra minúscula, en tipo de letra Times New Roman, tamaño 9.

Las tablas deberán ajustarse al tamaño de las columnas de la revista (19,5cm x 6,25cm) o al margen de la página (24cm x 18cm). El título debe ir en la parte superior y la leyenda en la parte inferior, solo con líneas divisorias horizontales en el encabezado y al final de la tabla. Deberán ser enviadas por separado en un archivo Excel en su formato original. La fuente debe ser Times New Roman 10. Serán rechazadas las tablas escaneadas o aquellas que no cumplan con estos requisitos.

La leyenda de las tablas serán escritas con letra Times New Roman, negritas, tamaño 10 por debajo y sin punto final.

Las fórmulas y estructuras químicas deberán ser realizadas en el programa ChemDraw, para luego importarlas al artículo. Así mismo deberán ser enviadas por separado en formato tiff o jpg.

Las ecuaciones matemáticas, las ecuaciones y las expresiones matemáticas deberán ser incluidas en el texto principal del artículo. Las ecuaciones que son citadas en el texto se identifican con números

entre paréntesis, tales como (1) y son citadas en el artículo como “ecuación (1)”.

Si el artículo está en formato .docx y contiene ecuaciones, las mismas deben ser editables.

Los valores numéricos deberán llevar “comas” y no puntos en los artículos en español. Serán estrictamente empleadas las unidades de medidas del sistema internacional, enmarcadas de acuerdo a lo recomendado en la siguiente tabla.

Gramos (g)	Kilómetros (km)	Hectárea (Ha)
Kilogramos (kg)	Metros (m)	Centímetros cúbicos (cm ³)
Miligramos (mg)	Centímetros (cm)	Milímetros cúbicos (mm ³)
Microgramos (μg)	Milímetros (mm)	Micrómetros cúbicos (μm ³)
Litros (L)	Micrómetros (μm)	Decímetros cúbicos (dm ³)
Mililitros (mL)	Metros cuadrados (m ²)	Hora (h)
Microlitros (μL)	Centímetros cuadrados (cm ²)	Minutos (min)
Decilitros (dL)	Milímetros cuadrados (mm ²)	Segundos (s)
Moles (mol)	Micrómetros cuadrados (μm ²)	Día (d)
Luxes (lx)	Normalidad (N)	Grados Fahrenheit (°F)
Lumen (lm)	Molalidad (m)	Kelvin (K)
Osmol (Osm)	Toneladas (t, T o Tn)	Atmosfera (atm)
Molaridad (M)	Grados Celcius (°C)	Pascal (Pa)
Newton (N)	Hertz (Hz)	Joule (J)
Kilocalorías (kcal)	Watt (W)	Volt (V)
Candela (cd)	Amperios (A)	Ohm (Ω)

Se recomienda el uso unificado en todo el documento de una sola unidad de medida, sin punto final. Para las unidades combinadas que implican relaciones, se recomienda el uso exponencial y no el uso de las barras (/). Ej: kcal.mol⁻¹, km.h⁻¹, m.s⁻¹

Todas las figuras, tablas y ecuaciones deberán estar enumeradas en orden secuencial dentro del artículo.

Nomenclatura y abreviaciones químicas y biológicas

Las estructuras moleculares son identificadas por números arábigos en negrita, que les son asignados en orden de presentación en el texto. Una vez identificadas en el texto principal o en una figura, los compuestos deben ser llamados por su nombre, por una abreviación definida o por el número arábigo en negrita (mientras el compuesto sea nombrado consistentemente de una de estas tres formas). Siempre que sea posible, los autores deben referirse a los compuestos químicos y las biomoléculas usando la nomenclatura sistemática, preferentemente utilizando IUPAC.

Material de referencia

La mención del material de estudio en el caso de especies vegetales, depositadas en herbarios reconocidos, se realizará en el siguiente orden: País, Departamento, Localidad, Coordenadas geográficas, Fecha de colecta, colector - número, Sigla del herbario en el cual está depositado.

Agradecimientos

Deberán escribirse en un apartado antes de las Referencias bibliográficas.

Aportes de los autores

Los autores deberán declarar sus contribuciones en el artículo y si existe o no conflicto de intereses.

Citas bibliográficas

» Para citas intratextuales:

- Un solo autor: Apellido del primer autor y año de publicación. Ejemplo: Vera, 2021
- Dos autores: Apellido de los dos autores y año de publicación. Ejemplo: Acosta y Domínguez, 2020
- Tres o más autores: Apellido del primer autor, seguido de *et al.*, y año de publicación. Ejemplo: Benítez *et al.*, 2019

Para las citas intratextuales se mantendrá el uso de “y”, sin importar el idioma del material consultado.

» Para citas directas, el año de publicación estará dentro de un paréntesis. Ejemplo: Según Pereira (2020), con más de un autor separados por punto y coma. Ejemplo: Según Pereira (2020); Ramos (2021). Para citas indirectas: (Pereira, 2020), con más de un autor: Pereira *et al.*, 2020; Ramos, 2021.

Referencias bibliográficas:

- » Serán considerados para revisión solo aquellos artículos que cumplan estrictamente las normativas vigentes referentes a las citas dentro del contenido y la coincidencia con lo mencionado en referencias bibliográficas.
- » Las referencias se realizarán siguiendo las normas APA última edición <https://normas-apa.org/wp-content/uploads/Guia-Normas-APA-7ma-edicion.pdf>
- » Se incluirán las citas intratextuales mencionadas en el artículo, en orden alfabético, utilizando sangría francesa.
- » Tanto autores como título del material consultado se escribirán en estilo de fuente normal, la letra inicial en mayúsculas, el resto en minúsculas.
- » Cuando se presenten varias citas de un mismo autor, se deberá mencionar siguiendo un orden cronológico (publicación más antigua a la más actual).
- » Cuando un mismo autor presente publicaciones siendo él, el único autor y publicaciones con otros autores; se deberá escribir la referencia bibliográfica correspondiente al único autor, seguido de las referencias bibliográficas con coautores.
- » El uso de “&” queda destinado solo para este apartado y si el material consultado se encuentra en inglés, si el material consultado se encuentra en español se mantendrá el uso de “y”.

Indicaciones para el envío del artículo

Antes de someter su artículo, el autor debe asegurarse de contar con:

Carta compromiso

El autor principal debe proveer una **carta de compromiso** siguiendo la plantilla de la revista *Steviana*, adjuntando los documentos respaldatorios.

La carta compromiso muestra el común acuerdo de todos los autores implicados en el artículo sometido a revisión y posterior publicación, sirviendo así de documento oficial por parte de la revista *Steviana*.

Es obligación del autor de correspondencia, la comunicación constante con los demás autores y coautores del artículo sometido a revisión, desde el momento del envío, las correcciones realizadas por los revisores, la versión final, hasta la prueba de página para la publicación final.

Envío de figuras y tablas por separado

Las figuras y tablas, deberán ser enviadas por separado en los formatos indicados anteriormente, al mismo tiempo que somete el artículo o una vez que el artículo sea aceptado. No serán aceptados como oficiales los presentes en el documento Word. **Es total responsabilidad del autor cumplir con los formatos requeridos por la revista, desde el momento que se somete a revisión el artículo**

Sugerencia de revisores

Al momento de someter el artículo, los autores pueden sugerir el nombre de al menos 4 potenciales revisores (2 nacionales y 2 internacionales); estas sugerencias suelen ser de ayuda, aunque no siempre son seguidas. Así mismo, también pueden indicar por nombre y apellido, un número limitado de científicos que no deben revisar el artículo.

Lista de comprobación para la preparación de envíos:

- » El envío no ha sido publicado previamente ni se ha sometido a consideración por ninguna otra revista (o se ha proporcionado una explicación al respecto en los Comentarios al editor/a).
- » El archivo de envío está en formato OpenOffice, Microsoft Word, RTF.
- » Siempre que sea posible, se proporcionan direcciones URL para las referencias.
- » El texto sigue el formato y las indicaciones mencionadas en el contenido de la guía para autores.
- » Todas las figuras y tablas se encuentran colocadas en los lugares del texto apropiados.
- » El texto reúne las condiciones estilísticas y bibliográficas incluidas en las directrices para autores.
- » Carta compromiso que acompaña al artículo sometido y las declaraciones (si aplica).

Proceso editorial

El proceso editorial consta de cuatro pasos:

1. Recepción del artículo

El artículo debe ser enviado por el sistema en línea de la revista, en formato Word, el cual será recepcionado por el Comité editorial, quienes realizarán una revisión inicial. En “comentarios al editor”:

- El autor puede sugerir 2 nombres de potenciales evaluadores nacionales y 2 internacionales; estas sugerencias serán de ayuda, aunque no necesariamente seguidas.
- El autor debe enviar el título abreviado (Título corto) para el encabezado de las páginas de su artículo.

En este primer paso, se debe adjuntar por separado la carta compromiso, la cual debe contar con la información de contacto del autor corresponsal y la firma de conformidad de todos los autores. En la misma debe explicar brevemente los fundamentos por los cuales el trabajo es considerado como apropiado para *Steviana* y manifestar la completa responsabilidad de los autores en cuanto a su contenido, exonerando de toda responsabilidad a la Revista.

La carta compromiso común acuerdo de todos los autores implicados en el artículo sometido a revisión, sirviendo así de documento oficial para de la revista *Steviana*. **Es obligación del autor de correspondencia**, la comunicación constante con los demás autores del artículo sometido a revisión, desde el momento del envío, las correcciones realizadas por los revisores, la versión final, hasta la prueba de página para la publicación final.

En el caso que hubiere conflictos de intereses, los autores deben adjuntar a su carta compromiso,

una declaración sobre los mismos. Para el caso de colectas, los autores deberán declarar en su carta compromiso, que han cumplido con las exigencias ambientales o de salud para la realización de la investigación.

En la revisión inicial, el Comité Editorial podrá realizar sugerencias que crea convenientes sobre el artículo, para mejorar su presentación y garantizar la publicación, antes del envío a los evaluadores para su revisión. De igual manera, la revista *Steviana* se reserva el derecho de aceptar o rechazar los artículos sometidos para su publicación.

2. Evaluación del artículo

La Revista *Steviana* utiliza el sistema de evaluación por pares, empleando el sistema doble ciego, donde la identidad de los evaluadores no es revelada a los autores y viceversa.

El evaluador podrá realizar las sugerencias o correcciones directamente sobre el artículo sometido utilizando el control de cambios de word. El documento contará con una hoja de evaluación proveído por el comité editorial para las anotaciones que crea conveniente.

El periodo de evaluación tendrá un plazo de aproximadamente un mes, dependiendo de la complejidad del artículo. El autor será notificado del estado de su artículo. Luego de la evaluación, el comité editorial podrá tomar la decisión de aceptación (con o sin modificaciones) o rechazo del artículo.

3. Devolución del artículo a los autores

El artículo devuelto a los autores puede presentar observaciones o correcciones. El mismo va acompañado de una hoja de evaluación con los criterios tenidos en cuenta por la revista, una columna con observaciones de los evaluadores y una columna libre donde los autores deberán especificar si el ajuste fue o no realizado, especificando con “realizado” en el caso que se haya procedido al ajuste o escribiendo una justificación corta y concisa en el caso que el mismo no haya sido realizado. El documento también cuenta con comentarios finales de “Aceptado”, “Aceptado con modificaciones”, “Rechazado”.

Posibles resultados:

- Rechazado: el artículo es devuelto al autor.
- Aceptado: el artículo es aceptado sin modificaciones y pasa a edición.
- Aceptado con modificaciones: el autor deberá aceptar o rechazar las correcciones o sugerencias realizadas al artículo, explicando al final, en la misma hoja de evaluación las sugerencias no aceptadas y enviando la nueva versión del artículo con los cambios realizados con color resaltado en el texto.

Una vez que el autor haya recibido la evaluación, debe responder a cada uno de los ítems e incorporar las modificaciones en el artículo, en un plazo no mayor a dos semanas, de lo contrario su artículo será retirado del número a ser publicado.

4. Aceptación, prueba de página y publicación

Una vez aceptado el artículo para su publicación, no se aceptarán modificaciones sobre el mismo y se solicitará enviar a la revista, las fotografías y tablas en los formatos según se menciona en la guía para autores para la diagramación y edición.

El autor por correspondencia recibirá una prueba de página en PDF, que deberá ser revisada en conjunto con los demás autores y devueltas al editor en un plazo no superior a 7 días. Deberán indicar directamente en el documento las correcciones o en un documento Word, en este caso indicando la página y párrafo en donde deberá realizarse la corrección.

Con la finalidad de la difusión del artículo definitivo en las redes sociales de la revista (Facebook, Instagram, Twitter), el autor por correspondencia deberá facilitar una breve descripción del mismo en lenguaje sencillo de no más de 280 caracteres, acompañado de una imagen que deberá ser seleccionada de entre las que acompañan al artículo sometido. La información podrá ser enviada al correo: steviana@facen.una.py

Derecho de autor y política de privacidad



A partir del año 2021, el contenido de esta revista se encuentra bajo una [Licencia Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0), que permite compartir y adaptar la obra en tanto se sigan los términos de la licencia.

Los nombres y las direcciones de correo electrónico introducidos en esta revista se usarán exclusivamente para los fines establecidos en ella y no se proporcionarán a terceros o para su uso con otros fines.

Steviana, Vol. 14 (1) - 2022

CONTENIDO POR SECCIONES

Florística

- 05-17 *Cereus aethiops* Haw. (Cactaceae) nueva cita para Paraguay
Pin Ferreira, A.; Rodríguez Montiel, L.; Friesen Ratzlaff, V.

Biotecnología

- 18-33 Detección *in silico* de fitomoléculas con potenciales actividades inhibitorias de Nucleolinas (NCL)
Gimenez Vera, S.; Gayozo, E.; Marín, L.
- 34-43 Producción de biomasa líquida de levaduras cerveceras en un medio de cultivo alternativo
Maciel, N.
- 44-54 Effectiveness of biological, botanical and synthetic products in the control of onion (*Allium cepa*) wilt caused by *Fusarium* sp. Resources for integrated management
Díaz-Nájera, J. F.; Ayvar-Serna, S.; Vargas-Hernandez, M.; Sanabria-Velázquez, A. D.; Cerezo-Aparicio, C. M.; Enciso-Maldonado, G. A.

