

2021
38:2



REVISTA
de la FACULTAD
de AGRONOMIA

Esta publicación científica en formato digital es continuación de la Revista Impresa:
Depósito legal pp 196802ZU42 ISSN 0378-7818



UNIVERSIDAD
DEL ZULIA
Maracaibo
Venezuela

Abril-Junio



**Autoridades de la
Facultad de
Agronomía
Universidad del
Zulia**

Dra. Ana Colina de Rubio
Decana (I)

Dra. Julia Martínez
Dir. de la Escuela de
Ingeniería Agronómica

Dr. Jorge Vilchez Perozo
Dir. del Instituto de
Investigaciones
Agronómicas

MSc. Emma Segovia
Dir. de la División de
Estudios para
Graduados.

MSc. Yulana Maldonado
Dir. de la División de
Extensión Agrícola



**Consejo
de Desarrollo
Científico,
Humanístico y
Tecnológico de la
Universidad del Zulia
(CONDES)**

Dra. Luz Maritza Reyes
Coordinador-
Secretario

Revista de la Facultad de Agronomía

Universidad del Zulia (Venezuela). Desde 1968

<https://www.produccioncientificualuz.org/index.php/agronomia>

Editores Asociados

Producción vegetal
MSc. Evelyn Pérez-Pérez
2019-2024 edcpp.revagricoluz@gmail.com
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
MSc. Beltran Briceño
Producción vegetal
2019-2024 beltranbriceno@fauz.edu.ve, bbr.revagricoluz@gmail.com
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
Dra. Lilia Urdaneta
Producción vegetal
2020-2025 lurdaneta@fauz.edu.ve, liliurdaneta@hotmail.com
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
Producción animal
Dra. Rosa Razz-García
2017-2020 rrazz@fauz.edu.ve, rosarazz@hotmail.com
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
Dra. Gretty Etienne-Rojas
Tecnología de alimentos
2017-2020 getienne@fauz.edu.ve, getienne26@gmail.com
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
MSc. Andriana Garcia
Tecnología de alimentos
2019-2024 andregarciadeg@gmail.com
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
Dra. Fátima Urdaneta
Socioeconomía
2019-2024. fatimaurdaneta@fauz.edu.ve, fatimaurdaneta@gmail.com
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Comité Asesor, año 2021

Mejoramiento animal Luis Fabian Yañez Zuleima Chirinos Gonzalo Martínez Producción vegetal Antonio Landeta Omar Araujo Pehar José M. Luginblut José Palma G. Ana Maria Arzalluz Reproducción animal Armando Quintero Rafaela Muñoz German Portillo Ninoska Madrid Ovinos y caprinos Luis Dickson Plátanos y bananans Vianel Rodríguez Biometría Angel Gómez Jorge Ortega Belkis Bracho Colyos Colmenares Fito protección Mauro Albarracín Nelly Delgado José V. Lasso Tecnología de alimentos Silvia Araujo Zulay Mármol Natalia González Forrageicultura Eduardo Chinea Danny García Frutales Angel Villegas Monter Dámazo Bautista Freddy Leal Thomas Osuna Alimentación Reinaldo Pire Orlando Rodríguez Eduardo Sergent Leguminosas Cecilia Peña Valdivia Atilio Higüera	Universidad del Zulia, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Universidad Central de Venezuela, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela North Carolina State University, Estados Unidos Universidad de Colima, México Universidad del Zulia, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas - Lara, Venezuela Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Venezuela, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Universidad Central de Venezuela, Venezuela Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas - Portuguesa, Venezuela Universidad Central de Venezuela, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas - Trujillo, Venezuela Universidad de la Laguna, España Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas - Trujillo, Venezuela Colegio de Postgraduados, México Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Venezuela Universidad Central de Venezuela, Venezuela Centro de Investigación en y Desarrollo AC - México Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Venezuela Universidad Central de Venezuela, Venezuela Universidad Central de Venezuela, Venezuela Universidad Central de Venezuela, Venezuela Universidad Central de Venezuela, Venezuela Colegio de Postgraduados, México Universidad del Zulia, Venezuela	Botánica Adriana Sanchez Elizabeth Cardenas Darisol Pacheco Maria Elena Sanabria Fitopatología Ana M. Cassasa-Padrón Renato Crozoli Alba Nava Pereira Dorian Rodriguez Gustavo Trujillo Fitopatología Carlos Trejo Douglas Marín José Mejías Ramon Jaime Mercedes de Serpa Fisiología post cosecha Reginaldo Biez Juan Manzano Judith Zambrano Socioeconomía y sistemas de producción Maria Elena Peña Eduardo Delgado Isneira Huerta María Alejandra Alizo Miguel Crespo Suelos Pedro Betancourt Nestor Noguera Stalin Torres Ambiente Ana Isabel Valenzuela	Universidad del Zulia, Venezuela Colegio de Postgraduados, México Universidad del Zulia, Venezuela Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Venezuela Universidad de Kentucky Universidad del Zulia, Venezuela Universidad Central de Venezuela, Venezuela Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas - Portuguesa, Venezuela Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas - Portuguesa, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Universidad Central de Venezuela, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Universidad Central de Venezuela, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Venezuela Universidad Central de Venezuela, Venezuela Colegio de Postgraduados, México Universidad Central de Venezuela, Venezuela Universidad Central de Venezuela, Venezuela Universidad de los Andes, Venezuela Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Venezuela Universidad de los Andes, Venezuela Universidad de los Andes, Venezuela Universidad de los Andes, Venezuela Universidad de los Andes, Venezuela Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC - México Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas - Barinas, Venezuela Universidad Nacional Experimental Rafel María Barbal, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Universidad Autónoma de la Laguna, México Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas - Lara, Venezuela Universidad del Zulia, Venezuela Universidad Central de Venezuela, Venezuela Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC - México
--	---	---	---

2021. Volumen 38: cuatro números por año. Frecuencia: Trimestral. ISSN: 2477-9407. Esta publicación científica en formato digital es continuación de la Revista Impresa: Depósito legal pp 196802ZU42, ISSN: 0378-7818. Todos los derechos reservados.

La Revista de la Facultad de Agronomía (Rev. Fac. Agron. LUZ), es una revista científica con reconocimiento nacional e internacional. El prestigio de su comité editorial y sus autores garantizan una amplia audiencia. Es respaldada por la Universidad del Zulia con la finalidad de difundir los resultados de investigadores venezolanos y de otras partes del mundo, relacionados con el ámbito agropecuario. Esta revista proporciona acceso abierto a su contenido, ofreciendo al público los resultados de las investigaciones, lo cual permite un mayor intercambio global del conocimiento.

Objetivo: publicar periódicamente artículos originales e inéditos, notas técnicas, revisiones por invitación, comunicaciones rápidas, resúmenes en extensos de congresos y reuniones científicas relacionadas con el área agropecuaria a consideración del Comité Editorial, producto de investigaciones agropecuarias de alta calidad científica y promover el intercambio de publicaciones y la actividad científica a nivel agropecuario.

Descripción: la Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia es una publicación del Instituto de Investigaciones Agronómicas de la Facultad de Agronomía (LUZ). Los tópicos que se incluyen son: gerencia de agrosistemas, ambiente, biotecnología agrícola, ciencia de la carne, ciencia de la leche, desarrollo rural, economía agrícola, entomología, fertilizantes, fisiología postcosecha, fisiología vegetal, fisiología y reproducción animal, pastos y forrajes, genética y mejoramiento animal y vegetal, arvenses, nutrición animal, patología vegetal, seguridad agroalimentaria, sistemas agroalimentarios y suelos.

Envío de manuscritos: información pertinente acerca de cómo elaborar los manuscritos se ofrece en cada número de la revista. Toda correspondencia debe ser enviada al Editor Jefe, Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. Correos electrónicos: agrovestaluz@gmail.com; revagronomia@fauz.edu.ve. Dirección: Avenida Guajira, Ciudad Universitaria, Núcleo Agropecuario, Facultad de Agronomía. Apartado 15205. Maracaibo, ZU 4001, Venezuela.

Revista de la Facultad de Agronomía

Rev. Fac. Agron. (LUZ)

Volumen 38 Número 2. Abril-Junio, 2021.

La Revista está indizada y/o catalogada en:
The journal is cataloged and/or indexed in:

Science Citation Index (SCIExpanded)

Scopus

Scimago Journal & Country Rank

Journal Citation Reports/Science Edition

Agris (FAO)

CAB International (Reino Unido)

Scielo Internacional

Latindex Catalogo

CIAT-Pastos Tropicales (Colombia)

Revenicyt (Venezuela)

Tropical Abstracts (Holanda)

Bionet (Venezuela)

Weed abstracts

Serials Cited Index

SilverPlatter Information

Agroforestry Abstracts

Orton (México)

Sistema de Información y Documentación Agrícola de

Venezuela y Electronic Sites of Leading Botany

Plant Biology and Science Journals

Periódica (México)

Dairy Science Abstracts

Field Crop Abstracts

Grasslands and Forage Abstracts

World Agricultural Economics and Rural Sociology

Abstracts

Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia

Maracaibo, Abril-Junio 2021. Vol. 38, Número 2. Págs. 216-459.

Índice

Producción Vegetal, Plant Production

- Evaluación de calidad de suelos plataneros a través de la actividad microbiana en el sur del lago de Maracaibo, estado de Zulia, Venezuela**
Evaluation of quality of banana soils through microbial activity in the south the lake of Maracaibo, Zulia state, Venezuela
Hebandreyana González García, Ana F. González Pedraza, JhoenAtencio y Anibal Soto **216-240**
- Doses e épocas de aplicação de nitrogênio via foliar na produção de milho para silagem na Amazônia Meridional**
Doses and times of nitrogen application via leaf in the production of corn for silage in the Southern Amazon
FellipeLemes da Rosa, Oscar MitsuoYamashit, Marco Antonio Camillo de Carvalho, RivanildoDallacort, Adriano Maltezo da Rocha y Lucas de Paula Mera **241-260**
- Micropropagation of *Pelargonium odoratissimum* (L.) L'Her. through petioles and leaves**
Micropropagación de *Pelargonium odoratissimum* (L.) L'Her., a través de explantes de hojas y pecíolos
Asghar Ebrahimzadeh, Maliheh Fathollahzadeh, Mohammad Bagher Hassan Pouraghdam, Mohammad Ali y Aazami Mavaloo **261-278**
- Relación entre factores agronómicos y nivel del daño por ardillas rojas a mazorcas de cacao en la Cordillera de Mérida, Venezuela**
Relationship between agronomic factors and level of damage by red squirrels to cocoa pods in the Cordillera de Merida, Venezuela
Misael Molina y Jesús Briceño **279-300**
- Selección de un consorcio microbiano promotor del crecimiento de plántulas de cebolla en condiciones de umbráculo**
Selection of a growth promoter microbial consortium in onion seedlings under shade-house conditions
Erika Lorena Blanco, Fermín Rada, Yulimar Castro y Jorge Paolini **301-321**

Características y rendimiento de semillas básicas de papa nativa (*Solanum goniocalyx*) obtenidas en biorreactor de inmersión temporal en condiciones de invernadero

Characteristics and yield of basic seeds of native potato (*Solanum goniocalyx*) obtained in temporary immersion bioreactor under greenhouse conditions

Doris Marmolejo Gutarra y Christopher P. Corpus Chagua

322-341

Adubos orgânicos e fertirrigação com esterco aviário fervido para o cultivo de morangueiro

Organic fertilizations and fertigation with chicken boiled manure for organic crop

Fernando Teruhiko Hata, Maria Tereza de Paula, Amanda A. Moreira, Mauricio Ursi Ventura, Romário Fortunato de Lima, Gustavo Adolfo de Freitas Fregonez y André Luiz Martinez de Oliveira

342-359

Producción Animal, Animal Production

Characterization of CRISPR genetic sequences in microorganisms associated with infections in shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Caracterización de secuencias genéticas CRISPR en microorganismos asociados a infecciones en camarón (*Litopenaeus vannamei*)

Ángel Parra, Carla Lossada, Aleivi Pérez, Johnny Navarrete, Lenin González

360-381

Incidencia del sombreado, biorreguladores y bioestimulante en el desarrollo y rendimiento del pasto Mombaza (*Panicum maximum* Jacq.)

Incidence of the shading, bioregulators and biostimulant on the growth and yield of Mombaza grass (*Panicum maximum* Jacq.)

Leonardo R. Jácome-Gómez y Maribel del C. Ramírez-Villalobos

382-403

Tecnología de Alimentos, Food Technology

Aprovechamiento de la almendra de semilla de mango para la obtención de aceite de repostería

Use of mango seed almonds to obtain pastry oil

Eileen Chiquinquirá Sanz, Diana Isadora Dix, Aycardo Emilio Robayo, Oscar Javier Bernal y Jorge Eliecer Carrillo

404-420

Frutos nativos de Perú como fuente potencial de nutrientes, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en el requerimiento nutricional de grupos vulnerables

Native fruits of Peru as a potential source of nutrients, bioactive compounds and antioxidant capacity in the nutritional requirements of vulnerable groups

Antonio José Obregón La Rosa, Garbiña Anadeira Talledo Rodríguez y Rember Emilio Pinedo Taco

421-440

**Valoración y disposición a pagar por los consumidores de elote
en México**

Valuation and willingness to pay for corn on the cob consumers in Mexico

Carla Zulema Jauregui García, Anastacio Espejel García, Arturo Hernández Montes





441-461

Evaluación de calidad de suelos plataneros a través de la actividad microbiana en el sur del lago de Maracaibo, estado de Zulia, Venezuela

Evaluation of quality of banana soils through microbial activity in the south the lake of Maracaibo, Zulia state, Venezuela

Avaliação da qualidade de solos de banana por meio da atividade microbiana no sul do Lago Maracaibo, estado de Zulia, Venezuela

Hebandreyna González García*, Ana F. González Pedraza, Jhoen Atencio y Anibal Soto

Universidad Nacional Experimental Sur del Lago “Jesús María Semprum” (UNESUR). Programa de Ingeniería de la Producción Agropecuaria. Laboratorio de Suelos. Santa Bárbara, estado Zulia. Venezuela. Correo electrónico: (EG) gonzalezh@unesur.edu.ve, ; (AG) anagonzalez11@gmail.com ; (JA) jhoenatencio@gmail.com, ; (AS) sotob@unesur.edu.ve, .

Resumen

La actividad microbiana puede servir como indicador del estado general del suelo, debido a que ésta es el reflejo de condiciones físico químicas óptimas para el desarrollo de los procesos metabólicos de microorganismos que actúan sobre los suelos por lo cual, constituye un indicador de la dinámica y la salud del recurso. Con la finalidad de evaluar la calidad de los suelos a través de la actividad microbiana en zonas cultivadas con plátano en el Sur del Lago de Maracaibo, se realizó un estudio en diferentes unidades de producción ubicadas en el municipio Colón del estado Zulia. Se seleccionaron lotes de plantas de plátano de alto y bajo vigor (AV y BV), se tomaron muestras compuestas de suelo de 0-20 cm de profundidad. Se determinó: carbono microbiano, respiración basal del suelo y cocientes microbiano y metabólico. Los resultados mostraron que los parámetros de vigor: número de manos por racimo; circunferencia del pseudotallo y altura del hijo de sucesión fueron significativamente más altos en AV con respecto a BV, mientras que, para el carbono microbiano, respiración basal del suelo y los cocientes microbiano y metabólico no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre lotes de vigor. La alta

Recibido el 03-06-2020 • Aceptado el 05-09-2020.

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: gonzalezh@unesur.edu.ve

actividad microbiana estuvo estrechamente relacionada con la textura del suelo y a su vez, ésta influyó positivamente en los parámetros biométricos de las plantas.

Palabras clave: respiración basal, carbono microbiano, plátano.

Abstract

Microbial activity can serve as an indicator for the overall state of the soil, because this is the reflection of optimum physical - chemical conditions for the development of the metabolic processes of microorganisms that act on soils. Therefore, shows the dynamic and the health of the resource. In order, to evaluate the quality of the soils through microbial activity in cultivated plantain areas of the South of Maracaibo lake, a study was carried out in different production units located in the Colón municipality of Zulia state. where, some plantain plants batches were selected with high and low vigor (AV and BV) and composite samples of soil were taken from 0 to 20 cm of depth. In this research, the following variables was determinate: microbial carbon, basal soil respiration, as well as microbial and metabolic ratios. The results showed that the vigor parameters: number of hands per bunch; circumference of pseudo-stem and height of the son of succession, were significantly higher in AV over BV; While the microbial carbon, basal respiration of soil and microbial and metabolic quotients did not display differences statistical significant between batches of force. The high microbial activity was closely related to the soil texture and this positively influenced the biometric parameters of the plants.

Key words: basal respiration, microbial carbon, plantain.

Resumo

A atividade microbiana pode servir como indicador do estado geral do solo, porque é o reflexo de condições físico-químicas ótimas para o desenvolvimento dos processos metabólicos dos microrganismos que actuam nos solos e, portanto, constitui um indicador da dinâmica e da saúde do recurso. A fim de avaliar a qualidade do solo através da atividade microbiana em áreas cultivadas com bananas no sul do Lago Maracaibo, foi realizado um estudo em diferentes unidades de produção localizadas no município de Colón, no estado de Zulia. Foram selecionados lotes de bananeiras de alto e baixo vigor (AV e BV), e foram colhidas amostras de solo composto de 0-20 cm de profundidade. Foram determinados os seguintes: carbono microbiano, respiração basal do solo, e rácios microbianos e metabólicos. Os resultados mostraram que os parâmetros de vigor: número de mãos por cacho; circunferência do pseudostem e altura do filho sucessório foram significativamente mais elevados em AV em relação à BV, enquanto para o carbono microbiano, respiração basal do solo e rácios microbianos e metabólicos não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre lotes vigorosos. A elevada atividade microbiana estava intimamente relacionada com a textura do solo, que por sua vez influenciou positivamente os parâmetros biométricos das plantas.

Palavras-chave: respiração basal, carbono microbiano, banana.

Introducción

De los componentes del medio físico y de los recursos ambientales que conforman el territorio venezolano, los suelos constituyen uno de los recursos centrales, por cuanto sus potencialidades dependen en buena medida, de la capacidad de producción de alimentos, fibras y maderas. Sin embargo, la producción agrícola convencional, está representada por el manejo intensivo de los suelos y sin conocer a detalle suficiente este importante recurso; lo cual causa una disminución de su calidad, especialmente en relación con la producción de alimentos (Elizalde *et al.*, 2007).

El concepto de calidad es funcional e incluye variables que sirven para evaluar la condición del suelo, o de los indicadores de calidad de suelo, los cuales son herramientas de medición que ofrecen información sobre las propiedades, procesos y características del suelo, asimismo, son atributos medibles que revelan la respuesta de la productividad o funcionalidad del suelo al ambiente, e indican si la calidad del suelo mejora, permanece constante o decrece (Ghaemi *et al.*, 2014). De igual forma, la actividad microbiana es una medida integrada de la calidad de los suelos, ésta se desarrolla de acuerdo con factores intrínsecos y extrínsecos al sistema suelo, por lo cual constituye un indicador de la dinámica del suelo y de la salud del recurso. Así, la actividad microbiana puede ser el reflejo de óptimas condiciones físicas y químicas que permitan el desarrollo de los

Introduction

Soils constitute, one of the central components of the physical environment and the environmental resources that integrate the Venezuelan territory, since, their potentialities depend to a large extent on the production capacity of food, fiber and wood. However, conventional agricultural production is represented by intensive soil management without sufficient knowledge of this important resource; which causes a decrease in the quality, especially in relation to the production of food (Elizalde *et al.*, 2007).

The concept of quality is functional and includes variables that serve to evaluate the condition of the soil, or the indicators of soil quality, which are measurement tools that offer information on the properties, processes and characteristics of the soil, as well as attributes measurable that reveal the response of soil productivity or functionality to the environment, and indicate whether soil quality improves, remains constant or decreases (Ghaemi *et al.*, 2014). The microbial activity is an integrated measure of soil quality, it develops according to intrinsic and extrinsic factors to the soil system, which is an indicator of the dynamics of the soil and the health of the resource. Thus, the microbial activity may be the reflect of optimal physical conditions and chemical permitting the development of the metabolic processes of bacteria, fungi, algae and actinomycetes besides of its action on organic substrates (Mora, 2006; Moreira and Siqueira, 2006).

procesos metabólicos de bacterias, hongos, algas y actinomicetos y de su acción sobre los substratos orgánicos (Mora, 2006; Moreira y Siqueira, 2006).

El plátano es el cuarto cultivo más importante del mundo después del arroz, el trigo y el maíz (Lescot, 2014). Esta fruta constituye la base de la alimentación de muchas regiones tropicales y además representa una importante fuente de ingresos para los productores. En cuanto a las exportaciones de plátano realizadas por Venezuela, esta variable ha presentado una tendencia decreciente para los últimos años del periodo 2012-2019 (FAO, 2020), esto indica que esta operación comercial decayó paulatinamente; lo que ha conllevado a la pérdida de mercado internacional y del comercio con países con los cuales se ha tenido intercambio comercial en el pasado, perdiendo así alternativas para generar ingresos adicionales procedentes de la exportación de productos agrícolas (Terán, 2017).

A nivel nacional, el 70 % aproximadamente de la producción de plátano se concentra en la zona Sur del Lago de Maracaibo, específicamente en los estados Zulia, Trujillo, Mérida y Táchira. El estado Zulia, por su parte, ocupa el mayor número de áreas sembradas y las unidades de producción más grandes, especialmente aquellas situadas entre los ríos Escalante, Mucujepe y en las riberas del río Chama (Anido y Cartay, 2010; Terán, 2017).

El incremento en la aplicación de insumos de alto costo, así como la búsqueda de tecnología de punta para tratar de detener la disminución

Plantain is the fourth most important crop in the world after rice, wheat and corn (Lescot, 2014). This fruit forms the basis of the diet of many tropical regions and also represents an important source of income for producers. Regarding, plantain exports made by Venezuela, has presented a decreasing trend for the last years for the period from 2012 to 2019 (FAO, 2020), this indicates that this commercial operation gradually declined and produced the loss of the international market besides trade with countries which there have been commercial exchange in the past, thus losing alternatives to generate additional income from the exportation of agricultural products (Terán, 2017).

At the national level, approximately 70 % of plantain production is concentrated in the southern area of Maracaibo lake, which includes the states of Zulia, Trujillo, Mérida and Táchira. The state of Zulia, for its part, occupies the largest number of planted areas and the largest production units, especially those located between the Escalante and Mucujepe rivers and on the Chama river banks. (Anido and Cartay, 2010; Terán, 2017).

The increase in the application of high - cost inputs as well as search technology to try to stop the dramatic decline in performance and the production of crops have contributed to the accelerated deterioration of the biological characteristics of the soil (Acuña *et al.*, 2006; Rosales *et al.*, 2006). In this research, given the importance of the crop in the

vertiginosa en el rendimiento y la producción de los cultivos han contribuido al deterioro acelerado de las características biológicas del suelo (Acuña *et al.*, 2006; Rosales *et al.*, 2006). En ese sentido y dada la importancia del cultivo en la zona de producción, en este trabajo se evaluó la calidad de los suelos cultivados con plátano (*Musa* AAB subgrupo plátano cv. Hartón), a través de la actividad microbiana en una zona del Sur del Lago de Maracaibo en el estado Zulia, Venezuela.

Materiales y métodos

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en diferentes unidades de producción ubicadas entre el km 35 y el km 41 de los sectores: El Uvito, Bancada de Limones, Caño Negro y Cuatro Bocas de la parroquia el Moralito, municipio Colón del estado Zulia, Venezuela. Esta zona se encuentra a una altitud de 8 msnm y cuenta con una precipitación acumulada anual que varía de 1200 a 1500 mm, una temperatura promedio al año de 38 °C y una humedad relativa máxima de 90 % y media de 85 %.

Selección de los sitios de muestreo

Se seleccionaron siete unidades de producción de plátano, de las cuales, seis cuentan con una superficie de menos de 10 ha y una entre 12 y 15 ha. De acuerdo con la metodología propuesta por Rosales *et al.* (2008), en las seis unidades de producción con menos de 10 ha se procedió a delimitar una parcela de 20 m x 50 m (1000 m²) por cada lote de vigor; y en la unidad

production area, the quality of soils cultivated with plantain (*Musa* AAB subgroup plantain cv. Harton) was evaluated, through microbial activity in an area of the South of Maracaibo lake in the Zulia state, Venezuela.

Materials and methods

Study area

The study was carried out in different production units located between km 35 and km 41 of the sectors: Uvito, Bancada de Limones, Caño Negro and Cuatro Bocas of Moralito parish, Colón municipality of Zulia state, Venezuela. This area has an altitude of 8 meters above sea level and an annual accumulated precipitation that varies from 1200 to 1500 mm with an average temperature per year of 38 °C; Moreover, a maximum relative humidity of 90 % and average of 85 %.

Selection of sampling sites

Seven plantain production units were selected, which six have an area less than 10 ha and one between 12 and 15 ha. According to the methodology proposed by Rosales *et al.*, (2008), in the six production units with less than 10 ha, a plot of 20 m x 50 m (1000 m²) was delimited for each vigor batch; and the production unit between 12 ha and 15 ha was demarcated by two plots with the same force per surface unit.

Criteria for selecting high and low vigor plants

The high and low vigor plants batches were selected using the criteria indicated by Rodríguez and Rodríguez (1998), who specifies that

de producción entre 12 y 15 ha se procedió a demarcar dos parcelas con la misma superficie por cada lote vigor.

Criterios para seleccionar plantas de alto y bajo vigor

La selección de lotes con plantas de alto y bajo vigor se realizó tomando el criterio señalado por Rodríguez y Rodríguez (1998), quienes señalan que valores de circunferencia del pseudotallo de la planta madre por encima de 76,36 cm en promedio y siete manos por racimo, pueden ser consideradas como el arquetipo ideal de la cepa madre de elevada productividad del plátano Hartón en Venezuela, así como también dieciséis hojas activas por retoño y una media de 5,48 hojas con ancho de lámina foliar mayor de 10 cm. Estos autores también indican que la comparación de estas características biométricas de las plantas madre y su retoño, con las de una plantación cualquiera, permitirían determinar si su potencial productivo es alto, así como también la base para el manejo de la plantación, complementar el diagnóstico nutricional del cultivo y determinar su potencial productivo.

Determinación de los parámetros de vigor de plantas

Para calcular la densidad poblacional de plantas por hectárea ($\text{plantas}\cdot\text{ha}^{-1}$) se procedió a multiplicar el número de plantas registradas en cada parcela de 1000 m² por 10 para relacionarlo a una hectárea. Igualmente, se seleccionaron 20 plantas con racimos próximos a ser cosechados que fueron marcados con cintas para determinar

circumference values of the mother plant pseudo-stem above of 76.36 cm on average and seven hands per bunch, can be considered as the ideal archetype of the high productivity mother strain of the Hartón plantain in Venezuela as well as sixteen active leaves per shoot with an average of 5.48 leaves and a leaf blade width greater than 10 cm. They also show that the comparison of these biometric characteristics of mother plants and their offspring, with respect to any plantation, would allow to determine if their productive potential is high, moreover be, the base for the management of the plantation alike the complement of the diagnosis nutrition crop and its productive potential.

Vigor parameters plant determination

To calculate the population density of plants per hectare ($\text{plants}\cdot\text{has}^{-1}$) proceeded to multiply the number of plants registered in each plot of 1000 m² for 10 to relate to one hectare. Similarly, 20 plants were selected with bunches near to be harvested that were marked with tape to determine the following vigor parameters: number of hands (finger set or plantain) per cluster, circumference of pseudo-stem and height of the succession child, parameters that are highly correlated with the production or vigor of the plantation (Rosales *et al.*, 2008). The circumference of the pseudo-stem is evaluated to the time of flowering, at the base of the stem to 100 cm from the ground, using a tape graduated. At the time of harvest, the height of

los siguientes parámetros de vigor: número de manos (conjunto de dedos o plátanos) por racimo, circunferencia del pseudotallo y altura del hijo de sucesión, parámetros que están altamente correlacionados con la producción o vigor de la plantación (Rosales *et al.*, 2008). La circunferencia del pseudotallo se evaluó al momento de la floración, en la base del tallo a 100 cm desde el suelo, utilizando una cinta métrica graduada. Al momento de la cosecha, se midió la altura del hijo de sucesión al frente del mismo, realizando esta medida desde el nivel del suelo hasta la inserción del pseudopecíolo de la última hoja expandida con la hoja candela.

Una vez desarrollado el racimo, se procedió a contar todas las “manos” de cada racimo, obteniéndose igualmente el total de dedos por racimo de la planta madre.

Diseño experimental y toma de muestras de suelos

El diseño de muestreo fue sistemático dirigido, éste se basa en el seguimiento de un patrón geométrico específico donde las muestras son tomadas a intervalos regulares a lo largo de ese patrón; en el cual se seleccionaron parcelas de 20 m x 50 m (1000 m²) con plantas de alto y bajo vigor.

Una vez seleccionadas las parcelas, se procedió a tomar las muestras de suelo para la determinación de los parámetros biológicos: carbono microbiano, respiración microbiana o respiración basal del suelo y cocientes microbiano y metabólico. En cada parcela seleccionada por

the sucker was measured in front of it, making this measured from the level of the ground to the insertion of the pseudo-petiole of the last sheet expanded with the candela sheet.

Once the cluster had developed, all the “hands” of each cluster were counted to get the total number of fingers per cluster of the mother plant.

Experimental design and soil sampling

The sampling design was directed systematically. It is based on the monitoring of a specific geometric pattern, where samples are taken at regular intervals along of pattern; in which, plots of 20 m x 50 m (1000 m²) with high and low vigor plants were selected.

Then, the soil samples were taken to determine the biological parameters: microbial carbon, microbial respiration or basal soil respiration, and microbial and metabolic quotients. In each plot selected per production unit, were taken in a zigzag form, nine simple samples with a 20 cm of depth to conform three composite samples, thus 48 samples in the total batch of vigor was obtained. The samples were taken, immediately, to the soils labs of microbiology and phytopathology at the Nacional Experimental University south of the lake, “Jesus Maria Semprum” for their respective processing.

Determination of physical-chemical characteristics of soil

Determination of the texture

The soil texture was determined following the hydrometer method of Gee and Bauder (1986). The process consisted in weighing 40 g of dry soil

unidad de producción se tomaron en forma de zigzag nueve muestras simples a la profundidad de 20 cm para conformar tres muestras compuestas, de esta manera se obtuvo 48 muestras compuestas en el total de lotes de vigor. Las muestras fueron llevadas inmediatamente a los laboratorios de suelo, de microbiología y de fitopatología de la Universidad Nacional Experimental Sur del Lago, "Jesús María Semprum", para su respectivo procesamiento.

Determinación de características físicas y químicas del suelo

Determinación de la textura

La textura del suelo se determinó siguiendo el método del hidrómetro de Gee y Bauder (1986). El procedimiento consistió en pesar 40 g de suelo seco tamizado con una malla No. 10. Se adicionaron 100 mL de una solución dispersante de 50 g de hexametáfosfato de sodio en 1 L de agua, se agitó en una licuadora durante 30 min y luego se transfirió a un cilindro graduado de 1 L, se adicionó agua destilada hasta completar el volumen y se agitó con una varilla de metal durante 1 min para homogenizar la mezcla. Luego de agitar la muestra a los 40 seg se midió la cantidad de arena con la ayuda de un hidrómetro. Este mismo procedimiento se realizó a las 8 h y 30 min para determinar el porcentaje de arcilla del suelo. Por diferencia entre ambas medidas se obtuvo el porcentaje de limo.

Determinación de humedad

La humedad gravimétrica (W) se determinó de acuerdo con la metodología propuesta por Gardner (1986). Una vez obtenido el peso de

sieved with a No. 10 mesh. Then, 100 mL of a dispersant solution of 50 g of sodium hexametaphosphate in 1 L of water were added, stirred in a blender for 30 min. After that, transferred to a 1 L graduated cylinder, where, distilled water was added until the volume was completed and stirred with a metal rod for 1 min to homogenize the mixture. After shaking the sample at 40 sec, the amount of sand was measured with a hydrometer. This same procedure was carried out at 8 h and 30 min to determine the percentage of clay in the soil. By difference between both measurements, the percentage of silt was obtained.

Determination of humidity

The gravimetric moisture (W) was determined according to the methodology proposed by Gardner (1986). Once the weight of wet soil and dry soil was obtained when the following equation was applied:

$$W = (\text{Wet soil weight} - \text{Dry soil weight}) / \text{Dry soil weight} * 100$$

Where:

W: soil moisture content.

Determination of active acidity

Active acidity was determined in aqueous extract with a soil-water ratio of 1: 2.5, by stirring for two hours (McLean, 1982), using a pH meter of the brand Digital pH meter, model "pH- 2006".

Determination of electrical conductivity

The electrical conductivity was determined in the same extract used for the active acidity determination, with a HANNA conductivity meter, model HI 9033, previously calibrated with a KCL

suelo húmedo y suelo seco se aplicó la siguiente ecuación:

$$W = (\text{Peso de suelo húmedo} - \text{Peso de suelo seco}) / \text{Peso de suelo seco} * 100$$

Dónde: W: contenido de humedad del suelo.

Determinación de acidez activa

La acidez activa se determinó en extracto acuoso con una relación suelo-agua de 1:2,5, en agitación durante dos horas (McLean, 1982), mediante el uso de un medidor de pH marca Digital pH meter, modelo "pH-2006".

Determinación de conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica se determinó en el mismo extracto utilizado para determinar la acidez activa, empleando un conductivímetro HANNA, modelo HI 9033, calibrado previamente con una solución de KCL 0,040 mol.L⁻¹ a una temperatura de 25 °C.

Determinación de materia orgánica total

La determinación de la materia orgánica total de suelo se realizó siguiendo el método de digestión húmeda propuesta por Walkley-Black (1934), modificado por Sims y Haby (1971). El procedimiento se basa en la oxidación incompleta del carbono orgánico por medio de una mezcla de dicromato de potasio y ácido sulfúrico. Se pesaron 0,5 g de muestra tamizada a 2 mm, se colocaron en una fiola de 125 mL, se le agregó 2 mL de una solución de dicromato de potasio 1N y 4 mL de ácido sulfúrico concentrado y se dejó en reposo toda la noche. Luego al siguiente día, el contenido de la fiola se trasladó a tubos plásticos con capacidad de 50 mL, para centrifugarlos durante 10 minutos.

solution of 0.040 mol.L⁻¹ with a temperature of 25 °C.

Determination of total organic matter

The determination of the total organic matter of the soil was carried out following the wet digestion method proposed by Walkley-Black (1934), modified by Sims and Haby (1971). The process is based on the incomplete oxidation of organic carbon by means of a mixture of potassium dichromate and sulfuric acid. 0.5 g of sample sieved to 2 mm were weighed, placed in a 125 mL flask, 2 mL of a 1N potassium dichromate solution and 4 mL of concentrated sulfuric acid were added and left to stand overnight. Then the next day, the contents of the flask were transferred to plastic tubes with a capacity of 50 mL, to be centrifuged for 10 minutes. Consecutively, they were transferred to 25 mL in a volumetric flask and made up to the mark with distilled water.

To perform the calibration curve, a glucose solution with a concentration of 50 mg C.mL⁻¹ was prepared. From this solution, 5, 10, 15 and 20 mL were taken with graduated pipettes and placed into 100 mL volumetric flasks, to obtain standards with C concentrations of 2.5; 5; 7.5 and 10 mg C.mL⁻¹. Subsequently, 1 mL of each standard solution were taken for be placed in 25 mL volumetric flasks and performed the same treatment described above for the soil samples. The absorbance of the standards and samples was measured in a UV-Visible photocolormeter of the brand Thermo-Scientific GENESYS 10uv Series at a wavelength of

Consecutivamente, se trasvasaron a balones aforados de 25 mL y se enraso con agua destilada.

Para realizar la curva de calibración se preparó una solución de glucosa con una concentración de 50 mg C.mL⁻¹. De esta solución se tomaron 5, 10, 15 y 20 mL con pipetas graduadas y se colocaron en balones aforados de 100 mL, para obtener patrones con concentraciones de C de 2,5; 5; 7,5 y 10 mg C.mL⁻¹. Posteriormente, se tomó 1 mL de cada solución patrón, se colocó en balones aforados de 25 mL y se realizó el mismo tratamiento descrito anteriormente para las muestras de suelo. La absorbancia de los patrones y las muestras se midió en un fotocolorímetro UV-Visible marca Thermo Scientific Serie GENESYS 10uv a una longitud de onda de 600 nm. La concentración de C (mg C.g⁻¹ muestra) en cada muestra de suelo se obtuvo a partir de la ecuación de regresión obtenida al graficar los datos de absorbancia de la curva de calibración versus las respectivas concentraciones de C de los patrones. Los resultados fueron calculados de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ COT} = (\text{mg C.g}^{-1} \text{ muestra}) * 0,2$$

Dónde:

% COT: Porcentaje de carbono orgánico total.

0,2: se obtiene de dividir 0,1 entre el peso del suelo usado (0,5 g). El valor de 0,1 resulta de transformar los mg C.g⁻¹ muestra en porcentaje.

El porcentaje de materia orgánica total se obtuvo de la siguiente manera:

$$\% \text{ MOT} = 1,724 * (\% \text{ COT})$$

600 nm. The C concentration (mg C.g⁻¹ sample) in each soil sample was obtained from the regression equation obtained by graphing the absorbance data of the calibration curve versus the respective C concentrations of the standards. The results were calculated according to the following formula:

$$\% \text{ TOC} = (\text{mg C.g}^{-1} \text{ sample}) * 0.2$$

Where:

% TOC: Percentage of total organic carbon.

0.2: obtained by dividing 0.1 in the weight of the soil used (0.5 g). The value of 0.1 results from transforming the mg C.g⁻¹ ample into a percentage.

The percentage of total organic matter was obtained as follows:

$$\% \text{ MOT} = 1.724 * (\% \text{ COT})$$

Where:

% MO: Percentage of total organic matter.

1.724: Van Bemmelen factor, which is based on the assumption that soil organic matter contains 58 % CO.

Determination of microbial activity of soils

The carbon associated with the soil microbial biomass was determined using the fumigation-extraction technique, in which the soil microbiota is killed with chloroform and extracted with a solution of potassium sulfate (K₂SO₄) 0,5 N (Vance et al . , 1987). For this, they were weighed and placed in a vacuum desiccator 5 g of fresh soil in beakers of 25 mL and a 30 mL beaker with free-chloroform ethanol. A vacuum was made to create an atmosphere of chloroform and allowed in the dark for 24 hours. For the samples without fumigation, the same procedure indicated above was fol-

Dónde:

% MO: Porcentaje de materia orgánica total.

1,724: Factor de Van Bemmelen, el cual parte del supuesto de que la materia orgánica del suelo contiene 58 % de CO.

Determinación de actividad microbiana de los suelos

El carbono asociado con la biomasa microbiana del suelo se determinó mediante la técnica de fumigación-extracción, en la cual se provoca la muerte de la microbiota del suelo con cloroformo y se extrae con una solución de sulfato de potasio (K_2SO_4) 0,5 N (Vance *et al.*, 1987). Para ello, se pesaron y colocaron en un desecador al vacío, 5 g de suelo fresco en vasos precipitados de 25 mL y un vaso precipitado con 30 mL de cloroformo libre de etanol, se hizo el vacío para crear una atmósfera de cloroformo y se dejó en la oscuridad por 24 horas. Para las muestras sin fumigar se siguió el mismo procedimiento antes señalado, pero en lugar de cloroformo se colocó agua destilada.

Consecutivamente, transcurridas las 24 horas, se sacaron los vasos precipitado de cada desecador y las muestras de suelo se transfirieron a tubos de 50 mL, se le adicionaron 25 mL de una solución de sulfato de potasio (K_2SO_4) 0,5 N, se agitaron por 30 minutos y se centrifugaron a 1500 rpm por 15-20 minutos. El sobrenadante se filtró en papel Whatman N° 1, se recogió en balones de 25 mL y se aforó con K_2SO_4 0,5 N. Los extractos se transfirieron a envases plásticos con tapa de rosca y se refrigeraron.

lowed, but instead of chloroform, distilled water was placed.

Consecutively, after 24 hours, they took off the beakers of each desiccator and the samples of soil were transferred to 50 mL tubes, they were added 25 mL of a solution of potassium sulfate (K_2SO_4) 0.5 N. then, were stirred for 30 minutes and were centrifuged at 1500 rpm for 15-20 minutes. The supernatant was filtered on Whatman paper No. 1, collected in 25 mL volumetric flasks and made up with 0.5 N K_2SO_4 . The extracts were transferred to plastic screw-top containers and refrigerated.

Then, a 4 mL aliquot of the extract was taken and placed in 100 mL digestion tubes to which added 1 mL of potassium dichromate solution ($K_2Cr_2O_7$) 0.0667 M and 5 mL of H_2SO_4 concentrated; Likewise, two blanks (cold and hot) were prepared, treated with the same amounts of $K_2Cr_2O_7$ and H_2SO_4 . The tubes with the samples and a blank (hot) were placed in a digester block previously heated to 150 °C for a period of 45 minutes. The tubes were allowed to cool and their contents were transferred to 100 mL flasks. 0.3 mL (3-4 drops) of ferroin indicator solution was added to each vial. Thus, for the determination of microbial carbon, the samples (M), the hot blank (BC) and the cold blank (BF) were titrated with a standardized solution of ammonia ferrous sulfate [$Fe (NH_4)_2 (SO_4)_2 \cdot 6H_2O$] 0.0333M. The organic carbon extracted in the fumigated and non-fumigated samples was calculated using the following formula:

Luego, se tomó una alícuota de 4 mL del extracto y se colocó en tubos de digestión de 100 mL a los que se le adicionó 1 mL de solución de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) 0,0667 M y 5 mL de H_2SO_4 concentrado; asimismo, se prepararon dos blancos (frío y caliente), tratados con las mismas cantidades de $K_2Cr_2O_7$ y H_2SO_4 . Los tubos con las muestras y un blanco (caliente) se colocaron en un bloque digestor previamente calentado a 150 °C por un período de 45 minutos. Los tubos se dejaron enfriar y su contenido se transfirió a fioas de 100 mL de capacidad. A cada fiola se le agregó 0,3 mL (3-4 gotas) de solución indicadora de ferroína. Así, para la determinación del carbono microbiano, de las muestras (M), el blanco caliente (BC) y el blanco frío (BF) fueron titulados con una solución estandarizada de sulfato ferroso amoniacal [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$] 0,0333M. El carbono orgánico extraído en las muestras fumigadas y no fumigadas se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$C \text{ (mg.k}^{-1} \text{ suelo)} = (A) \cdot (N \text{ sulfato}) \cdot (0,0033) \cdot (K) \cdot (1000) \cdot (1000) / (V) \cdot (P)$$

Dónde:

$$A = ((BC - M) \cdot (BF - BC)) / BF + (BC - M)$$

M= solución de sulfato ferroso amoniacal gastada durante la titulación de la muestra (mL)

BC= solución de sulfato ferroso amoniacal consumido durante la titulación del blanco caliente (mL)

BF= solución de sulfato ferroso amoniacal consumido durante la titulación del blanco frío (mL)

N= normalidad del sulfato ferroso amoniacal (0,0333)

$$C \text{ (mg.k}^{-1} \text{ suelo)} = (A) \cdot (N \text{ sulfato}) \cdot (0,0033) \cdot (K) \cdot (1000) \cdot (1000) / (V) \cdot (P)$$

Where:

$$A = ((BC - M) \cdot (BF - BC)) / BF + (BC - M)$$

M = ferrous ammoniacal sulfate solution spent during the titration of the sample (mL)

BC = ammoniacal ferrous sulfate solution consumed during hot blank titration (mL)

BF = ammoniacal ferrous sulfate solution consumed during cold blank titration (mL)

N = normality of ammonium ferrous sulfate (0.0333)

V = aliquot extract (mL)

0.003 = weight of 1 milliequivalent carbon (g)

K = Amount of extractant solution of potassium sulfate (mL)

P = dry weight of the sample (g)

Similarly, the amount of C in the soil biomass (C_{mic}) was calculated as follows:

$$C_{mic} = EC \cdot KEC^{-1}$$

Where:

EC = (Organic C in the extract of the fumigated sample) - (Organic C in the extract of the non-fumigated sample)

KEC = 0.38. Correction factor that represents the extractable fraction of the total carbon bound to the microbial biomass.

For microbial respiration or basal soil respiration, the analysis was carried out using the static incubation technique, where the concentration of CO_2 released (product of biological activity and the content of easily mineralizable organic carbon present in the soil) is analyzed. CO_2 is captured

V= alícuota del extracto (mL)

0,003= peso de 1 miliequivalente de carbono (g)

K= cantidad de la solución extractante de sulfato de potasio (mL)

P= peso seco de la muestra (g)

De igual manera, la cantidad de C en la biomasa del suelo (Cmic), se calculó de la siguiente manera:

Dónde:

EC= (C orgánico en el extracto de la muestra fumigada) – (C orgánico en el extracto de la muestra no fumigada)

KEC= 0,38. Factor de corrección que representa la fracción extraíble del total del carbono unido a la biomasa microbiana.

Para la respiración microbiana o respiración basal del suelo, el análisis se realizó mediante la técnica de incubaciones estáticas, donde se analiza la concentración de CO₂ desprendido (producto de la actividad biológica y del contenido de carbono orgánico fácilmente mineralizable presente en el suelo). El CO₂ es capturado en una solución alcalina (NaOH 0,2 N), durante 10 días de incubación bajo condiciones ambientales óptimas (Alef y Nannipieri, 1995). De esta manera, se pesó 20 g de suelo húmedo sin tamizar, colocándolo en un frasco con capacidad de 500 mL, consecutivamente se introdujo un vial con 15 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 0,2N, con el fin de atrapar el CO₂ liberado, posteriormente se selló el frasco y se colocó en la oscuridad con una temperatura aproximada de 22 °C.

Por consiguiente, se tituló la solución de hidróxido de sodio con ácido clorhídrico estandarizado (HCl) 1 N

in an alkaline solution (0.2 N NaOH), during 10 days of incubation under optimal environmental conditions (Alef and Nannipieri, 1995). In this way, 20 g of moist soil was weighed without sieving, placing it in a flask with a capacity of 500 mL; Then, a vial with 15 mL of 0.2 N sodium hydroxide (NaOH) was introduced, in order to trap the CO₂ released, after that, the flask was subsequently sealed and placed in the dark with an approximate temperature of 22 ° C.

Therefore, the sodium hydroxide solution was titrated with standardized hydrochloric acid (HCl) 1 N, after precipitation, of the carbonates with a 0.05 N barium chloride (BaCl₂) solution and phenolphthalein was used as indicator. In the case of the (blanks), glass containers alone with 0.2N NaOH traps were used to determine the CO₂ content in the air. The calculations were made based on the weight of the dry soil and the results were expressed in mg C-CO₂ kg⁻¹ 24 h. In the same way, the amount of mg of C released in form of CO₂ was calculated using the following formula:

$$\text{mg C} - \text{CO}_2 = (\text{VB} - \text{VM}) \times \text{NHCL} \times 6$$

Where:

VB = amount of hydrochloric acid spent to titrate the blank

VM = amount of hydrochloric acid spent to titrate the soil sample

NHCL = Normality of hydrochloric acid

6 = equivalent weight of carbon

The determination of the microbial quotient was carried out through relation between the

previa precipitación de los carbonatos con una solución de cloruro de bario (BaCl_2) 0,05 N y se usó fenoltaleína como indicador. En el caso de los (blancos) se utilizaron recipientes de vidrio solos con trampas de NaOH 0,2N para determinar el contenido de CO_2 del aire. Los cálculos se hicieron con base en el peso del suelo seco y los resultados se expresaron en $\text{mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} 24 \text{ h}$. De la misma forma, se calculó la cantidad de mg de C desprendidos en forma de CO_2 mediante la siguiente fórmula:

$$\text{mg C} - \text{CO}_2 = (\text{VB} - \text{VM}) \times \text{NHCL} \times 6$$

Dónde:

VB= cantidad de ácido clorhídrico gastado para valorar el blanco

VM= cantidad de ácido clorhídrico gastado para valorar la muestra de suelo

NHCL= Normalidad del ácido clorhídrico

6= peso equivalente del carbono

La determinación del cociente microbiano se realizó mediante la relación del carbono de la biomasa microbiana y el carbono orgánico total del suelo. Mientras que para el cociente metabólico (qCO_2) se relacionó la respiración basal del suelo ($\mu\text{g C-CO}_2$) con la cantidad de biomasa microbiana (mg C-biomasa) por unidad de tiempo (hora) (Anderson y Domsch, 1989).

Diseño experimental

Una vez obtenidos los resultados de campo y laboratorio se procedió a realizar un análisis de varianza porque se cumplieron los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianza a independencia de los datos. Cuando el ANOVA fue significativo ($p < 0,05$) se

carbon of the microbial biomass and the total organic carbon of the soil. While, for the metabolic quotient (qCO_2) basal soil respiration ($\mu\text{g C-CO}_2$) was related to the amount of microbial biomass (mg C-biomass) per unit of time (hour) (Anderson and Domsch, 1989).

Experimental design

After the field and laboratory results were obtained, an analysis of variance was realized because the assumptions of normality, homogeneity of variance and data independence were satisfied. When the ANOVA was significant ($p < 0.05$), a Tukey mean comparison test was applied through the Statistix version 8.0 program.

Results and discussion

Parameters on the force of the plantain plants

The hands number per bunch (NMR), the circumference of pseudo-stem (CP) and the height of the sucker (AHS), were significantly ($p < 0.05$) higher in the plantain plants batches with high vigor (AV) compared to low vigor (BV). Also, to performing the estimation of the plant density (DP) per hectare significant trend was reflected and greater in batches of high vigor (Table 1).

Similar results were reported by González-Pedraza *et al.* (2014), in a plantain-grown farm located at the Francisco Javier Pulgar municipality, Zulia state, Venezuela, with relatively similar characteristics soil. The high vigor batches had a greater: number of hands per bunch, pseudo-stem

aplicó una prueba de comparación de medias de Tukey, a través del programa Statistix versión 8,0.

Resultados y discusión

Parámetros sobre el vigor de las plantas de plátano

El número de manos por racimo (NMR), la circunferencia del pseudotallo (CP) y la altura del hijo de sucesión (AHS), fueron significativamente ($p < 0,05$) más altos en lotes de plantas de plátano de alto vigor (AV) con respecto a los de bajo vigor (BV); asimismo, al realizar la estimación de la densidad de plantas (DP) por hectárea se reflejó una tendencia significativa y mayor en lotes de alto vigor (cuadro 1).

circumference of the mother plant and a height of the successional son, compared to the low vigor batches. For their part, Hernández *et al.* (2007) at the El Paraíso area (LN: 8°56'00" and LW: 71°22'00"), Colón municipality, south of the Maracaibo Lake in Zulia state, Venezuela, didn't detect statistically significant differences in the number of hands per bunch on soils with a silty loam to silty clay loam texture or with pH from 7.7 to 7.1.

The average value for the pseudo-stem circumference (CP) in high vigor batches were relatively high, related to the data reported (55.9 cm) by Delgado *et al.* (2008), in a study carried out in the central region of Barinas state, Venezuela, under soil

Cuadro 1. Parámetros de vigor de plantas de plátano en el Sur del Lago de Maracaibo, de la parroquia el Moralito, municipio Colón, estado Zulia, Venezuela.

Table 1. Vigor parameters of plantain plants at the South of Maracaibo Lake, Moralito parish, Colón municipality, Zulia state, Venezuela.

Vigor de plantas	NMR	CP (cm)	AHS (m)	DP (plantas.ha ⁻¹)
AV	7,50±0,97 ^{a*}	66,86±8,29 ^a	2,56±0,53 ^a	3140
BV	4,96±0,89 ^b	59,44± 9,16 ^b	2,03±0,48 ^b	2595
P	<0,05	<0,05	<0,05	

*Valor promedio ± desviación estándar seguido por letras minúsculas diferentes entre las columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) por prueba de Tukey entre lotes de vigor de plantas de plátano. AV: Lotes de plantas de alto vigor. BV: Lotes de plantas bajo vigor. NMR: número de manos por racimo; CP: circunferencia del pseudotallo; AHS: altura del hijo de sucesión.

*Average value ± standard deviation followed by different lowercase letters between columns indicate significant differences ($p < 0.05$) between vigor batches of plantain plants, by means of Tukey's test. AV: high vigor plants batches. BV: Low vigor plants batches. NMR: hands number per bunch; CP: circumference of pseudo-stem; AHS: height of succession child.

Resultados similares fueron reportados por González-Pedraza *et al.* (2014), en una finca cultivada

and climate conditions very similar to those of this study, in plantain plantations (*Musa* AAB cv. Hartón

con plátano ubicada en el municipio Francisco Javier Pulgar del estado Zulia, Venezuela, con características de suelos relativamente similares. Los lotes de alto vigor presentaron mayor número de manos por racimo, circunferencia del pseudotallo de la planta madre y altura del hijo de sucesión, que los lotes de bajo vigor. Por su parte, Hernández *et al.* (2007) en una zona de El Paraíso (LN: 8°56'00" y LW: 71°22'00"), municipio Colón, al Sur del Lago de Maracaibo del estado Zulia, Venezuela, no detectaron diferencias estadísticamente significativas en el número de manos por racimo, en suelos con textura de franco limoso a franco arcillo limoso, con pH de 7,7 a 7,1.

El valor promedio para la circunferencia del pseudotallo (CP) en lotes de alto vigor fueron relativamente altos, en comparación con los datos reportados (55,9 cm) por Delgado *et al.* (2008), en un trabajo realizado en la región central del estado Barinas, Venezuela, bajo condiciones de suelo y clima muy similares a las de este estudio, en plantaciones de plátano (*Musa* AAB cv. subgrupo plátano Hartón) con densidades de siembra de 1111 plantas.ha⁻¹; de igual forma, este valor (66,86 cm) es bajo al relacionarse con lo señalado por González-Pedraza *et al.* (2014) con 80,95 cm en CP.

Características físicas y químicas en los suelos cultivados con plátano

En las características químicas evaluadas, tales como: la acidez activa, la conductividad eléctrica, la materia orgánica y el carbono orgánico total, no se observaron diferencias significativas entre los lotes de

plantain subgroup) with planting densities of 1111 plants. ha⁻¹. In the same way, this value (66, 86 cm) is low related to that indicated by González-Pedraza *et al.* (2014) with 80.95 cm in CP.

Physical and chemical characteristics in soils cultivated with plantain

In the chemical characteristics evaluated, such as, the active acidity, the electrical conductivity, the organic matter and the total organic carbon, no significant differences were observed between the batches of AV and BV like on the percentages of clay in both vigor batches (Table 2). There were statistically significant differences in the percentages of moisture, silt and sand between the AV and BV batches; observing a higher percentage of moisture and silt in AV batches compared to those of BV, and sand in BV batches, which probably influenced the lower percentage of moisture found in those batches. These results are similar to those reported by González-Pedraza *et al.* (2014), whose pointed out that the moisture content and the silt percentage were significantly lower ($p < 0.05$) in the low vigor batches, while the sand percentage was higher in them.

Microbial carbon in plantain-grown soils

No significant differences ($p > 0.05$) were observed in microbial carbon (CMIC) of soils between high and low vigor batches (figure 1).

The Cmic values found in the AV and BV lots are higher than those reported for other cultivated tropical

AV y los de BV; al igual que en los porcentajes de arcilla en ambos lotes de vigor (cuadro 2). De igual forma, hubo diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de humedad, limo y arena entre los lotes de AV y de BV; observándose mayor porcentaje de humedad y limo en lotes de AV con respecto con los de BV, y de arena en los de BV, lo cual probablemente incidió en el menor porcentaje de humedad encontrado en esos lotes.

soils (De Barros *et al.*, 2007). Unlike the results found in this study, González-Pedraza *et al.* (2014), where, were found significant differences ($p < 0.05$) in the Cmic between high vigor (VA) and low vigor (BV) batches. These authors, point out that the AV batches had lower content Cmic regarding BV, concluding that the soils in AV are subjected to greater stress condition compared with BV, and the texture is playing an important role in this behavior.

Cuadro 2. Características físicas y químicas en los suelos con plantas de plátano de alto (AV) y bajo vigor (BV) en el Sur del Lago de Maracaibo, de la parroquia el Moralito, municipio Colón, estado Zulia, Venezuela.

Table 2. Physical and chemical characteristics in high vigor (AV) and low vigor (BV) soils on plantain plants at the South of Maracaibo Lake, Moralito parish, Colón municipality, Zulia state, Venezuela.

Características	Vigor de plantas	
	AV	BV
Limo (%)	77,54±0,11 ^a	63,54±0,40 ^b
Arcilla (%)	4,79±0,20 ^a	4,81±0,22 ^a
Arena (%)	17,66±0,48 ^b	31,66±0,47 ^a
Humedad (%)	20,11±0,23 ^a	15,46±0,19 ^b
Acidez activa	5,87±0,05 ^a	6,01±0,06 ^a
Conductividad eléctrica (mS.cm ⁻¹)	0,12±0,09 ^a	0,09±0,05 ^a
Materia orgánica (%)	5,90±0,24 ^a	6,23±0,29 ^a
Carbono orgánico total (%)	3,46±0,23 ^a	3,61±0,29 ^a

*Valor promedio ± desviación estándar seguido por letras minúsculas diferentes entre las columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$), por prueba de Tukey. AV: Plantas de alto vigor. BV: Plantas de bajo vigor.

*Average value ± standard deviation followed by different lowercase letters between columns indicate significant differences ($p < 0.05$), by means of Tukey's test. AV: high vigor plants batches. BV: Low vigor plants batches.

Estos resultados son similares a los reportados por González-Pedraza *et al.* (2014), quienes señalaron que el contenido de humedad y el porcentaje de limo fueron significativamente más bajos ($p < 0,05$) en los lotes de bajo

Similarly, the levels of microbial carbon are affected by agroclimatology that affects samples *in situ*, i.e., moisture, heat, organic waste biodiversity to the ecosystem and aggressive substances to the microbial

vigor, mientras que el porcentaje de arena resultó más alto en los lotes de plantas de bajo vigor.

Carbono microbiano en los suelos cultivados con plátano

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el carbono microbiano (Cmic) de los suelos entre los lotes de alto y bajo vigor (figura 1).

Los valores de Cmic encontrado en los lotes de AV y BV están por encima a los reportados para otros suelos tropicales cultivados (De Barros *et al.*, 2007). A diferencia de los resultados encontrados en este estudio, González-Pedraza *et al.* (2014), encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el Cmic entre lotes de alto vigor (AV) y bajo vigor (BV). Estos autores señalan que los lotes AV presentaron menor contenido de Cmic con respecto a BV, concluyendo que los suelos en AV están sometidos a una mayor condición de estrés en comparación con BV, y la textura está desempeñando un papel importante en este comportamiento.

De igual forma, los niveles de carbono microbiano se ven afectados por la agroclimatología que afecta las muestras *in situ*, es decir, la humedad, el calor, la biodiversidad de residuos orgánicos al ecosistema y por sustancias agresivas a la actividad microbiana (Acuña *et al.*, 2006). En este estudio es posible que el mayor porcentaje de humedad ($20,10 \pm 8,18$) encontrado en los suelos de AV con respecto a los de BV ($15,46 \pm 7,06$) permita unas mejores condiciones del suelo para la realización de la actividad de los microorganismos del suelo.

activity (Acuña *et al.*, 2006). In this study, it is possible that the highest percentage of moisture (20.10 ± 8.18) found in soils of AV with respect to those of BV (15.46 ± 7.06) allows better soil conditions to carry out the activity of soil microorganisms.

Basal soil respiration (C-CO₂)

Statistically significant differences ($p > 0.05$) were not observed in the basal soil respiration between high and low vigor plantain batches (figure 2). However, manifested a slight increase in the C-CO₂ in batches of BV. The basal respiration data (C-CO₂) obtained in this study were higher than those reported in other tropical agricultural soils (De Barros *et al.*, 2007; González-Pedraza *et al.*, 2014).

For their part, González-Pedraza *et al.* (2014), observed significant differences between plantain batches production, being higher in batches of AV with respect to those of the BV; difference, possibly attributed to the composition of the microbial communities of both soils; Even though, the microorganisms present in each site were not characterized. Respiration is an indicator of microbial activity and the decomposition of specific soil substrates (Acuña *et al.*, 2006); Likewise, it gives an idea of the dynamics of its biota and, therefore, of the metabolic processes that develop in it; Such processes, vary depending on the biophysical and climatic factors of the soil and the use of the soil, for which, their measurement is an indicator of the microbial biomass present.

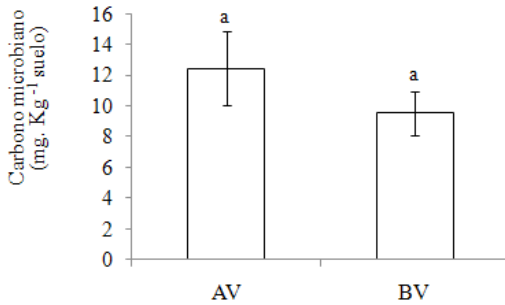


Figura 1. Carbono microbiano en suelos con plantas de plátano de alto y bajo vigor en el Sur del Lago de Maracaibo, de la parroquia el Moralito, municipio Colón, estado Zulia, Venezuela. Columnas ± barras de error estándar acompañadas por letras distintas señalan diferencias estadísticas entre lotes de plantas de plátano ($p < 0,05$). AV: Lotes de plantas de alto vigor. BV: Lotes de plantas de bajo vigor.

Figure 1. Microbial carbon in soils with high and low vigor plantain plants at the South of Maracaibo Lake, Moralito parish, Colón municipality, Zulia state, Venezuela. *Columns ± standard error bars accompanied by different letters indicates statistical differences between plantain plants batches ($p < 0.05$). AV: High vigor plants batches. BV: Low vigor plant batches.

Respiración basal del suelo (C-CO₂)

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en la respiración basal de los suelos entre lotes de plantas de plátano de alto y bajo vigor (figura 2). No obstante, se manifestó un ligero incremento en la C-CO₂ en lotes de BV. Los datos de respiración basal (C-CO₂) obtenidos en este estudio fueron mayores a los reportados en otros suelos agrícolas tropicales (De Barros *et al.*, 2007; González-Pedraza *et al.*, 2014).

Por su parte, González-Pedraza *et al.* (2014), observaron diferencias significativas entre lotes de producción de plátano, siendo más altos en lotes de AV con respecto a los de BV; diferencia

C-CO₂ accumulated respiration

For the second day of incubation the same values of mg C. kg soil⁻¹.day⁻¹ were observed, as AV batches as in those of BV. Between batches more C-CO₂ was appreciated in BV compared to AV (figure 3). By the fourth day of incubation there was an accelerated increase in C-CO₂ in AV batches, which drastically decreased on the tenth day of incubation. On the other hand, in the BV batches, C-CO₂ increase during the fourth incubation day and gradually decreased by the 10th day of incubation.

The activity of the microorganisms that intervene at

atribuida posiblemente a la composición de las comunidades microbianas de ambos suelos, aun cuando no se caracterizó a los microorganismos presentes en cada sitio. La respiración es un indicador de la actividad microbiana y de la descomposición de sustratos específicos del suelo (Acuña *et al.*, 2006); igualmente, da una idea de la dinámica de su biota y, por lo tanto, de los procesos metabólicos que en él se desarrollan; tales procesos varían en función de factores biofísicos y climáticos del suelo y del uso de la tierra, por lo cual su medición es un indicador de la biomasa microbiana presente.

the beginning of the mineralization process of organic matter is maximum, as a consequence of having a large quantity of easily biodegradable compounds available from the organic starting materials (Acosta *et al.*, 2006). After the seventh day in BV batches there was a gradual decrease in accumulated respiration; This is probably due to the depletion of the most labile substrate, leaving only those materials with greater resistance to degradation. Generally, breathing accumulated at the fourth and seventh day of incubation, in

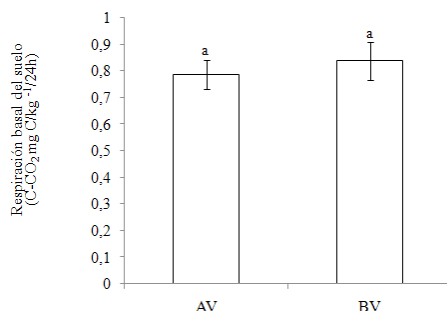


Figura 2. Respiración basal de los suelos con plantas de plátano de alto y bajo vigor en el Sur del Lago de Maracaibo, de la parroquia el Moralito, municipio Colón, estado Zulia, Venezuela. Columnas ± barras de error estándar acompañadas por letras distintas señalan diferencias estadísticas entre lotes de plantas de plátano ($p < 0,05$). AV: Lotes de plantas de alto vigor. BV: Lotes de plantas de bajo vigor.

Figure 2. Basal respiration of soils with high and low vigor plantain plants in the South of Lake Maracaibo, in the El Moralito parish, Colón municipality, Zulia state, Venezuela. *Columns ± standard error bars accompanied by different letters indicate statistical differences between plantain plants batches ($p < 0.05$). AV: High vigor plants batches. BV: Low vigor plant batches.

Respiración acumulada de C-CO₂

Para el segundo día de incubación se observó los mismos valores de mg C.kg suelo⁻¹.día⁻¹, tanto en lotes de

both production batches, was between 21 and 27 C-CO₂ mg C.kg⁻¹ soil.day⁻¹. The variation of the basal respiration of soils cultivated with plantain vigor batches can be explained by the use of

AV como en los de BV. Entre lotes se apreció un mayor C-CO₂ en BV con respecto a AV (figura 3). Para el cuarto día de incubación hubo un incremento acelerado del C-CO₂ en lotes de AV, el cual disminuyó drásticamente al décimo día de incubación. Por su parte, en los lotes de BV el C-CO₂ subió durante el cuarto día incubación y decreció gradualmente para el día diez de incubación.

herbicides, synthetic fertilizers and by humidity. For example, studies carried out with glyphosate, it is capable of stimulating microbial respiration, which can be 3 or 4 times higher than in soils without application of this herbicide (Ratcliff *et al.*, 2006). This management corresponds to that carried out by the producers in high vigor plantain plants batches, making applications of this systemic herbicide

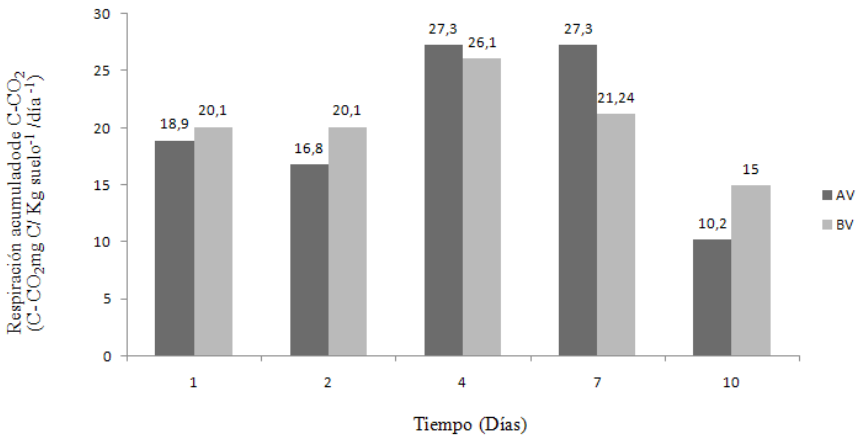


Figura 3. Respiración acumulada de C-CO₂ en un tiempo de diez días en suelos con plantas de plátano en el Sur del Lago de Maracaibo, de la parroquia el Morality, municipio Colón, estado Zulia, Venezuela. AV: Lotes plantas de alto vigor. BV: Lotes de plantas de bajo vigor.

Figure 3. Accumulated respiration of C-CO₂ in ten days on soils with plantain plants at the South of Maracaibo Lake, Morality parish, Colón municipality, Zulia state, Venezuela. *AV: High vigor plant batches. BV: Low vigor plant batches.

La actividad de los microorganismos que intervienen al inicio del proceso de mineralización de la materia orgánica es máxima, como consecuencia de tener a su alcance gran cantidad de compuestos fácilmente biodegradables procedentes de los materiales orgánicos de partida (Acosta *et al.*,

with pre-established doses and frequencies. Higher humidity of the soil is another key factor that stimulates microbial respiration (Adachi *et al.*, 2006) broadly higher percentage moisture contents were observed in high vigor batches with respect to the low vigor batches (Table 2).

2006). Después del séptimo día en lotes de BV hubo un descenso gradual de la respiración acumulada, esto probablemente se deba al agotamiento del sustrato más lábil, quedando solamente aquellos materiales de mayor resistencia a la degradación. En general, la respiración acumulada al cuarto y séptimo día de incubación, en ambos lotes de producción fue entre 21 y 27 C-CO₂ mg C.kg⁻¹ suelo.día⁻¹. La variación de la respiración basal de suelos cultivados con lotes de vigor de plátano puede explicarse por el uso de herbicidas, fertilizantes sintéticos y por la humedad. Por ejemplo, estudios realizados con glifosato, es capaz de estimular la respiración microbiana, la cual puede ser 3 o 4 veces mayor que en suelos sin aplicación de este herbicida (Ratcliff *et al.*, 2006). Este manejo corresponde con el realizado por los productores en los lotes de alto vigor de plantas de plátano, efectuando aplicaciones de este herbicida sistémico con dosis y frecuencias preestablecidas. Una mayor humedad del suelo es otro factor clave que estimula la respiración microbiana (Adachi *et al.*, 2006), en términos generales se observaron mayores contenidos porcentuales de humedad en lotes de alto vigor con respecto con los de bajo vigor (cuadro 2).

Cociente microbiano (Cmic/COT) y cociente metabólico (qCO₂)

El análisis de varianza no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) en el cociente microbiano y cociente metabólico entre lotes de AV y lotes de BV (figura 4 y 5). Los datos de Cmic/COT fueron similares a los reportados por González-Pedraza *et al.* (2014).

Microbial quotient (Cmic/TOC) and metabolic quotient (qCO₂)

The analysis of variance did not show significant differences ($p > 0.05$) in the microbial quotient and metabolic quotient between VA batches and BV batches (figures 4 and 5). The Cmic/COT data were similar to those reported by González-Pedraza *et al.* (2014).

In the case of qCO₂, the values obtained are below those reported in other studies (Acuña *et al.*, 2006); results that are similar to those obtained by González-Pedraza *et al.* (2014), whose indicate, a tendency to spent more C in respiration of AV plantain batches.

Conclusions

The higher percentage of moisture and silt found in the soils of the high vigor batches had a positive influence on the biometric vigor parameters evaluated in the plants.

Even though, no statistical differences were observed for the values of microbial carbon and basal soil respiration between high and low vigor plants batches, these are high compared to the values for tropical soils, which indicates, a better quality of the organic substrate that is degrading.

The variability found in the texture of the soil product of its alluvial origin influenced to the few statistical differences observed in the microbial activity of the soil.

End of English Version

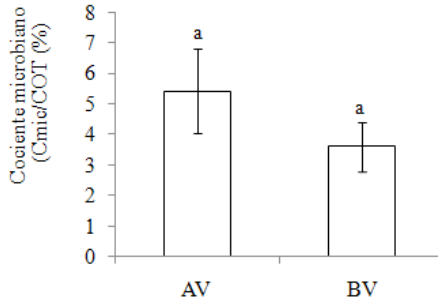


Figura 4. Cociente microbiano de los suelos cultivados con plantas de plátano de alto y bajo vigor en el Sur del Lago de Maracaibo, de la parroquia el Moralito, municipio Colón, estado Zulia, Venezuela. Columnas ± barras de error estándar acompañadas por letras distintas señalan diferencias estadísticas entre lotes de plantas de plátano ($p < 0,05$). AV: Lotes de plantas de alto vigor. BV: Lotes de plantas de bajo vigor.

Figure 4. Microbial quotient of the soils cultivated with high and low vigor plantain plants at the South of Maracaibo Lake, Moralito parish, Colón municipality, Zulia state, Venezuela. *Columns ± standard error bars accompanied by different letters indicate statistical differences between plantain plants batches ($p < 0.05$). AV: High vigor plants batches. BV: Low vigor plant batches.

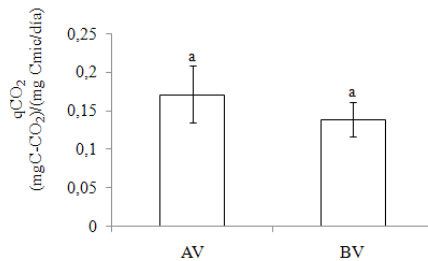


Figura 5. Cociente metabólico (qCO_2) de los suelos cultivados con plantas de plátano de alto y bajo vigor en el Sur del Lago de Maracaibo, de la parroquia el Moralito, municipio Colón, estado Zulia, Venezuela. Columnas ± barras de error estándar acompañadas por letras distintas señalan diferencias estadísticas entre lotes de plantas de plátano ($p < 0,05$). AV: Lotes de plantas de alto vigor. BV: Lotes de plantas de bajo vigor.

Figure 5. Metabolic quotient (qCO_2) of the soils cultivated with high and low vigor plantain plants at the South of Maracaibo Lake, Moralito parish, Colón municipality, Zulia state, Venezuela. *Columns ± standard error bars accompanied by different letters indicate statistical differences between plantain plants batches ($p < 0.05$). AV: High vigor plants batches. BV: Low vigor plant batches.

Para el caso de qCO_2 , los valores obtenidos están por debajo a los reportados en otros estudios (Acuña *et al.*, 2006); resultados que se asemejan a los obtenidos por González-Pedraza *et al.* (2014), quienes indican una tendencia a un mayor gasto de C en respiración en lotes de plátano de AV.

Conclusiones

El mayor porcentaje de humedad y limo encontrado en los suelos de los lotes de alto vigor influyó positivamente en los parámetros biométricos de vigor evaluados en las plantas.

Aun cuando no se observaron diferencias estadísticas para los valores de carbono microbiano y respiración basal del suelo entre lotes de plantas de alto y bajo vigor, éstos son altos en comparación con los valores para suelos tropicales, lo cual indica una mejor calidad del sustrato orgánico que se está degradando.

La variabilidad encontrada en la textura del suelo producto de su origen aluvial influyó en las escasas diferencias estadísticas observadas en la actividad microbiana del suelo.

Literatura citada

Acuña, O., W. Peña, E. Serrano, L. Pocasangre, F. Rosales, E. Delgado, J. Trejos y A. Segura. 2006. La importancia de los microorganismos en la calidad y salud de suelos. XVII. Reunión Internacional da Associação para a Cooperação Pesquisas sobre Banana no Caribe e na América Tropical. Santa Catarina- Brasil. ACORBAT. p. 222-232.

Acosta, Y., J. Cayama, E. Gómez, N. Reyes, D. Rojas y H. García. 2006. Respiración

microbiana y prueba de fitotoxicidad en el proceso de compostaje de una mezcla de residuos orgánicos. *Multiciencias*. 6(3): 220- 227.

Adachi, M., Y. Sakata, W. Rashidah, T. Okuda and H. Koizumi. 2006. Differences in soil respiration between different tropical ecosystems. *App. Soil Ecol.* 34:258-265.

Alef, K. and P. Nannipieri. 1995. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, London. 576 p.

Anderson, T. and K. Domsch. 1989. Application of eco-physiological quotients (qCO_2 and qD) on microbial biomass from soils of different cropping histories. *Soil Biol. Biochem.* 22: 251-255.

Anido, J. y R. Cartay. 2010. El plátano en la gastronomía venezolana (*Musa paradisiaca* Hartón cv). 1 ed. Editorial Océano. 188 p.

De Barros, I., J. Siqueira e F. De Sousa. 2007. Características biológicas do solo indicadoras de qualidade após dois anos de aplicação de biossólido industrial e cultivo de milho. *Rev. Bras. Cienc. Solo.* 31:1173-1184.

Delgado, E., N. Gómez, O. González y C. Marín. 2008. Evaluación a nivel de finca del efecto de la alta densidad de siembra en plátano (*Musa* AAB cv. Subgrupo plátano Hartón), municipio Obispo, Barinas, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 25: 603-616.

Elizalde, G, J. Vilorio y A. Rosales. 2007. Geografía de suelos de Venezuela. Tomo 2. GeoVenezuela. Medio físico y Recursos Ambientales. p. 402-537. ISBN 978-980-379-167-4. Fundación Empresas Polar. Depósito legal 1f 25920079102498.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2020. Análisis del mercado del banano: resultados preliminares 2019. Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/3/ca7567es/CA7567ES.pdf>. Fecha de consulta: julio 2020.

Gardner, W. 1986. Water content. p. 493-544. *In*: Klute, A. (Ed.). *Methods of soil analysis, Part I: Physical and*







- mineralogical methods. Agronomy. Second edition, number 9; American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Wisconsin, United States of America.
- Gee, G. and J. Bauder. 1986. Particle-size Analysis. p. 383-412. *In*: Klute, A. (Ed.). Methods of soil analysis, Part I: Physical and mineralogical methods. Agronomy. Second edition, number 9; American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Wisconsin, United States of America.
- Ghaemi, M., A. Astaraei, H. Emami, M. Nassiri and S. Sanaeinejad. 2014. Determining soil indicators for soil sustainability assessment using principal component analysis of Astan Quds- east of Mashhad- Iran. *J. Soil Sci. Plant Nut.* 14: 987-1004.
- González-Pedraza, A., J. Atencio, K. Cubillán, R. Almendrales, L. Ramírez y O. Barrios. 2014. Actividad microbiana en suelos cultivados con plátano (*Musa* AAB subgrupo plátano cv. Hartón) con diferente vigor de plantas. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 31 (Supl.): 526-538.
- Hernández, Y., M. Marín y J. García. 2007. Respuesta en el rendimiento del plátano (*Musa* AAB cv. Hartón) en función de la nutrición mineral y su ciclo fenológico. Parte I. Crecimiento y producción. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 24: 607-626.
- Lescot, T. 2014. La diversité génétique des bananiers. *FruiTrop*. 221:98-102.
- McLean, O. 1982. Soil pH and Lime Requirement. p. 199-224. *In*: Page, A. L., Miller, R. H. y Keeney, D. R. (Eds.). Methods of soil analysis, Part II: Chemical and microbiological properties. Agronomy. Second edition, number 9; American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Wisconsin, United States of America.
- Mora, J. 2006. La actividad microbiana: un indicador integral de la calidad del suelo. Disponible en: http://lunazul.ucaldas.edu.co/downloads/Lunazul5_6_9.pdf. Fecha de consulta: marzo 2017.
- Moreira, F. y J. Siqueira. 2006. Microbiología e Bioquímica do Solo. 2 ed. Editora UFLA. 729 p.
- Ratcliff, A., M. Busse and C. Shestak. 2006. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Appl. Soil Ecol.* 34:114-124.
- Rodríguez, V. y O. Rodríguez. 1998. Biometría de la cepa de plátano (*Musa* AAB subgrupo plátano cv. Hartón) en plantas con rendimientos superiores a 18 kilogramos por racimo, en Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 15:439-445.
- Rosales, F., L. Pocasangre, J. Trejos, E. Serrano y W. Peña. 2008. Guía de diagnóstico de la calidad y salud de suelos. Bioersivity International. Montpellier, Francia. 79 p.
- Rosales, F., L. Pocasangre, J. Trejos, E. Serrano, O. Acuña, A. Segura, E. Delgado, T. Pattison, W. Rodríguez y Ch. Staver. 2006. Guía para el diagnóstico de la calidad y la salud de suelos bananeros. Reunión Internacional da Associação para a Cooperaõnas Pesquisas sobre Banana no Caribe e na América Tropical. Santa Catarina- Brasil. Association pour la Cooperation des Recherches Bananieres Aux Antilles et en Amerique Tropicale (ACORBAT). p. 198-206.
- Sims, J. and V. Haby. 1971. Simplified colorometric determination of soil organic matter. *Soil Sci.* 112: 137-141.
- Terán, F. 2017. Análisis económico del cultivo de plátano (*Musa* AAB cv. 'Hartón') en Venezuela durante el período 1989-2014. Trabajo de grado presentado como requisito final para optar al título de Magister Scientiarum en Desarrollo Rural, mención Economía Agrícola. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía.
- Vance, E., P. Brookes and D. Jenkinson. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. *Soil Biol. Biochem.* 19:703-707.

Doses e épocas de aplicação de nitrogênio via foliar na produção de milho para silagem na Amazônia Meridional

Dosis y épocas de aplicación de nitrógeno vía foliar en la producción de maíz para ensilado en la Amazonia Meridional

Doses and times of nitrogen application via leaf in the production of corn for silage in the Southern Amazon

Fellipe Lemes da Rosa¹; Oscar Mitsuo Yamashita^{2*}; Marco Antonio Camillo de Carvalho³; Rivanildo Dallacort⁴; Adriano Maltezo da Rocha⁵ y Lucas de Paula Mera⁶

¹Engenheiro Agrônomo. Consultor Técnico. Impacto Insumos Agrícolas. Matupá. Mato Grosso. Brasil. Correio eletrônico: fellipe_lemes@hotmail.com.  ²Engenheiro Agrônomo. Professor Doutor do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos. Universidade do Estado de Mato Grosso. Campus Universitário de Alta Floresta. Rodovia MT 208, km 147, Jardim Tropical. 78580-000. Caixa Postal 324. Alta Floresta. Mato Grosso. Brasil. Correio eletrônico: yama@unemat.br,  ³Engenheiro Agrônomo. Professor Doutor do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos. Universidade do Estado de Mato Grosso. Campus Universitário de Alta Floresta. Correio eletrônico: marcocarvalho@unemat.br,  ⁴Engenheiro Agrícola. Professor Doutor do Programa de Pós-graduação em Ambiente e Sistemas de Produção Agrícola. Universidade do Estado de Mato Grosso. Campus Universitário de Tangará da Serra. Mato Grosso. Brasil. Correio eletrônico: rivanildo@unemat.br,  ⁵Engenheiro Agrônomo. Estudante de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências do Solo. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Campus Universitário de Jaboticabal. São Paulo. Brasil. Correio eletrônico: admr.maltezo@hotmail.com,  ⁶Engenheiro Agrônomo. Professor Mestre Instituto Federal de Mato Grosso. Campus Avançado de Guarantã do Norte. Mato Grosso. Brasil. Correio eletrônico: lucas.mera@gta.ifmt.edu.br, 

Recibido el 29-05-2020 • Aceptado el 08-09-2020.

*Autor de correspondencia. Correio eletrônico: yama@unemat.br

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar a aplicação via foliar de nitrogênio em doses e épocas distintas, como complemento à adubação via solo. O trabalho foi conduzido em área experimental no município de Terra Nova do Norte – MT, localizado na região da Amazônia Meridional. Os tratamentos foram constituídos pela combinação de aplicações foliares de nitrogênio nas doses de 0, 250, 500 e 750 mL.ha⁻¹, e de duas épocas de aplicação com intervalos diferentes: 15 e 40 dias após a emergência; e 25 e 40 dias após a emergência. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições, no esquema fatorial 4 x 2, totalizando oito tratamentos. Verificou-se que as variáveis produtividade de massa verde e seca de plantas e espigas, índice Spad e comprimento de espigas responderam positivamente quanto à doses de N, não havendo efeito de épocas de aplicação. Observou-se também que a aplicação foliar de nitrogênio aumentou a produtividade do milho para silagem, sendo que melhores resultados são obtidos a partir de 750 mL.ha⁻¹ do fertilizante foliar estudado. Não houve acréscimo de fatores produtivos quando a aplicação foliar de nitrogênio era parcelada.

Palavras-chave: *Zea mays* L., adubação nitrogenada, aplicação foliar, produtividade.

Resumen

El objetivo del trabajo fue evaluar la aplicación vía foliar de nitrógeno en dosis y épocas distintas, como complemento a la fertilización vía suelo. El trabajo fue conducido en un área experimental del municipio de Terra Nova do Norte - MT, Brasil, ubicado en la región de la Amazonia Meridional. Los tratamientos estuvieron constituidos por la combinación de aplicaciones foliares de nitrógeno en las dosis de 0, 250, 500 y 750 mL. ha⁻¹, y dos tiempos de aplicación con diferentes intervalos: 15 y 40 días después de la emergencia; y 25 y 40 días después de la emergencia. El diseño experimental fue en bloques al azar con cuatro repeticiones, en el esquema factorial 4 x 2, totalizando ocho tratamientos. Se verificó que las variables productividad de masa verde y seca de plantas y espigas, y longitud de espigas respondieron positivamente en cuanto a las dosis de N y épocas de aplicación. También se observó que la aplicación foliar de nitrógeno incrementó la productividad del maíz para ensilaje, y se obtienen mejores resultados a partir de 750 mL.ha⁻¹ del fertilizante foliar estudiado. No hubo aumento en los factores de producción cuando se dividió la aplicación foliar de nitrógeno.

Palabras clave: *Zea mays* L., fertilización nitrogenada, aplicación foliar, productividad.

Abstract

The objective was to evaluate the application of foliar nitrogen in different doses and times, as a complement to soil fertilization. The work was conducted

in a rural area of the municipality of Terra Nova do Norte – MT, located in the southern of Brazilian Amazon. The treatments were a combination of foliar applications of nitrogen at doses of 0, 250, 500 and 750 mL.ha⁻¹, and two application times with different intervals: 15 and 40 days after emergence; and 25 and 40 days after the emergency. The experimental design was a randomized block with four replications, in a factorial 4 x 2, totaling eight treatments. It was found that the variables green mass productivity and dried plant and ear and ear length responded positively as the N rates and application times. It was also observed that the foliar application of nitrogen increased the productivity of corn for silage, and better results are obtained from 750 mL.ha⁻¹ of the studied leaf fertilizer. There was no increase in production factors when the foliar application of nitrogen was split.

Keywords: *Zea mays* L., nitrogen fertilization, foliar application, productivity.

Introdução

O milho (*Zea mays*) é cultivado em diversas regiões de todo mundo, com grande destaque no cenário mundial, pois é uma cultura de forte expressão econômica e social principalmente por sua diversidade nas formas de consumo e suas qualidades nutricionais. Recentemente, esta espécie tem merecido destaque internacional pela intensa produção avançar em áreas que outrora não era cultivada em larga escala: a região amazônica.

A cultura do milho tem a vantagem de poder ser explorada de diferentes formas, seja como grãos ou massa verde, onde a maior parte da produção tem destino à alimentação animal (como ração e/ou silagem) e a menor parte para consumo humano.

Segundo CONAB (2020), a produção brasileira de milho na safra 2019/2020 vai atingir 100,6 milhões de toneladas de grãos, em uma área plantada de 4,2 milhões de hectares, com um aumento de 3,1 % na produção em relação à safra anterior. No entanto, segundo

Introducción

El maíz (*Zea mays* L.) se cultiva en diferentes regiones del mundo, con gran importancia en el escenario mundial, por ser un cultivo de fuerte expresión económica y social, principalmente por su diversidad en las formas de consumo y sus cualidades nutricionales. Recientemente, esta especie ha merecido un protagonismo internacional debido al intenso avance de la producción en áreas que no se cultivaban a gran escala en el pasado: la región amazónica.

El cultivo del maíz tiene la ventaja de poder ser explotado de diferentes formas, ya sea como granos o materia verde, donde la mayor parte de la producción se destina a la alimentación animal (como pienso y/o ensilaje) y en menor cuantía para el consumo humano.

Según CONAB (2020), la producción brasileña de maíz en la cosecha 2019/2020 llegará a 100,6 millones de toneladas de grano, en un área sembrada de 4,2 millones de

Pereira (2013), apenas 15 % da área cultivada de milho no país é destinada à produção de silagem.

Apesar do alto potencial produtivo da cultura do milho, evidenciado por produtividades de 10 e 70 Mg.ha⁻¹ de grãos e de forragem, respectivamente, alcançadas no Brasil em condições experimentais e por agricultores que adotam tecnologias adequadas, o que se observa na prática é que sua produção é muito baixa e irregular (Embrapa, 2009).

A cultura do milho vem se consolidando como importante mercadoria brasileira. Apesar do decréscimo na produção, o Brasil ainda apresenta grande oferta em relação à demanda existente no mercado mundial. Esta forte produção nacional está diretamente ligada aos avanços tecnológicos ocorridos nos últimos anos, que promoveram maior produtividade por área plantada.

Segundo Meira *et al.* (2009), o nitrogênio (N) é o elemento mineral mais exigido pelo milho, podendo ser limitante no desenvolvimento da cultura. O milho, assim como as demais espécies de plantas gramíneas, requer o uso de adubação nitrogenada para compensar a remoção desse nutriente e para complementar a quantidade suprida pelo solo (Malavolta *et al.*, 1997). O N é um constituinte essencial dos aminoácidos, principais integrantes das proteínas. Como a formação de grãos e massa verde depende das proteínas na planta, a produção de milho está diretamente relacionada com o suprimento de N (Basi *et al.*, 2011). De acordo com Farinelli e Lemos (2010) o N atua

hectáreas, con un aumento de 3,1 % en la producción en comparación con la cosecha anterior. Sin embargo, según Pereira (2013), solo el 15 % del área cultivada de maíz en el país se destina a la producción de ensilaje.

A pesar del alto potencial produtivo del cultivo de maíz, evidenciado por rendimientos de 10 y 70 Mg.ha⁻¹ de granos y forrajes, respectivamente, logrados en Brasil en condiciones experimentales y por agricultores que adoptan tecnologías apropiadas, lo cual se observa en la práctica. es que su producción es muy baja e irregular (Embrapa, 2009).

La cosecha de maíz se ha consolidado como un importante producto básico brasileño. A pesar de la disminución de la producción, Brasil todavía tiene una gran oferta en relación con la demanda existente en el mercado mundial. Esta fuerte producción nacional está directamente ligada a los avances tecnológicos ocurridos en los últimos años, los cuales han promovido una mayor productividad por área plantada.

Según Meira *et al.* (2009), el nitrógeno (N) es el elemento mineral más requerido por el maíz y puede ser limitante en el desarrollo del cultivo. El maíz, como otras especies de plantas herbáceas, requiere el uso de fertilizante nitrogenado para compensar la absorción de este nutriente y complementar la cantidad aportada por el suelo (Malavolta *et al.*, 1997). El N es un componente esencial de los aminoácidos, los principales componentes de las proteínas. Como la formación de granos y materia verde depende de las proteínas de la

no desenvolvimento vegetativo, influenciando diretamente a divisão e expansão celular e o processo fotossintético da planta.

Quanto ao parcelamento e época de aplicação existe o conceito generalizado de que se aumentando o número de parcelamento da adubação nitrogenada aumenta-se a eficiência do uso do fertilizante e reduzem-se as perdas, principalmente por lixiviação e volatilização (Scivittaro *et al.*, 2010). O fornecimento adequado de N, no momento correto e em dose adequada, é fundamental para o ótimo desenvolvimento e crescimento da cultura (Yamada, 1996). A recomendação de parcelamento para a cultura do milho é de 500 a 750 mL.ha⁻¹ sendo duas aplicações: entre o vigésimo e vigésimo quinto dias após a emergência e outra após 15 dias da primeira aplicação (Malavolta *et al.*, 1997).

Segundo a marcha de absorção do N a maior exigência deste pela cultura do milho acontece nos estádios V4-V5, durante o estágio vegetativo, onde a cultura mais necessita do nutriente, pois é nessa fase que inicia o processo de diferenciação floral, definindo o potencial de produção, e se o suprimento não for adequado poderá haver diminuição no rendimento da cultura (Silva *et al.*, 2012).

A adubação foliar é uma prática complementar à adubação realizada via solo visando o fornecimento de macro e micronutrientes e segundo Bennett *et al.* (2011), a aplicação de nitrogênio foliar consiste na utilização de ureia (ou outra fonte) diluída em água e aplicada em sistema de

planta, la producción de maíz está directamente relacionada con el suministro de N (Basi *et al.*, 2011). Según Farinelli y Lemos (2010), el N actúa sobre el desarrollo vegetativo, influyendo directamente en la división y expansión celular y el proceso fotosintético de la planta.

Encuanto al tipo de fraccionamiento y aplicación, existe un concepto generalizado de que aumentar el número del fraccionamiento de la fertilización nitrogenada, aumenta la eficiencia del uso del fertilizante y reduce las pérdidas, principalmente por lixiviación y volatilización (Scivittaro *et al.*, 2010). El aporte adecuado de N, en el momento oportuno y en una dosis adecuada, es fundamental para el óptimo desarrollo y crecimiento del cultivo (Yamada, 1996). La recomendación de abono para el maíz es de 500 a 750 mL.ha⁻¹, con dos aplicaciones: entre los 20 y 25 días posteriores a la emergencia y otra a los 15 días desde la primera aplicación (Malavolta *et al.*, 1997).

Según la curva de absorción de N, la mayor demanda de N por el maíz se encuentra en las etapas V4-V5, durante la etapa vegetativa, donde el cultivo necesita más el nutriente, ya que es en esta etapa que comienza el proceso de diferenciación floral, definiendo el potencial producción, y si el suministro no es adecuado, puede haber una disminución en el rendimiento del cultivo (Silva *et al.*, 2012).

La fertilización foliar es una práctica complementaria a la fertilización del suelo, que tiene como objetivo el aporte de macro y

pulverização. Nesse procedimento a absorção foliar de nitrogênio é mais eficiente, pois se utilizam de pequenas quantidades por hectare de nitrogênio devido à maior absorção e reduzindo as perdas por lixiviação (Aguiar *et al.*, 2006).

Assim, para a cultura do milho, torna-se importante a suplementação de nitrogênio via foliar almejando a melhor disposição deste nutriente às plantas, principalmente em estágios de maior exigência nutricional pela cultura.

A partir do exposto, objetivou-se avaliar a resposta da cultura do milho em função da aplicação de doses crescentes de nitrogênio, com aplicação via foliar em diferentes épocas, na complementação da adubação via solo.

Material e métodos

Área de estudo

O experimento foi conduzido em propriedade localizada no município de Terra Nova do Norte – MT, na latitude 10°30'55,66" S, longitude 55°09'11,01" O e altitude de 290 m. Este município está localizado na região definida como Amazônia Meridional, no extremo norte do estado de Mato Grosso, Brasil. A área onde foi realizada pesquisa nos últimos anos foi utilizada com pastagem, em sistema extensivo de criação bovina.

A análise química do solo realizada anteriormente à implantação ao estudo e na profundidade de 0-0,20 m do solo apresentou as seguintes características: pH (CaCl₂) = 4,4; P = 3,1 mg.dm⁻³; K, Ca, Mg, Al e H = 0,0084; 0,8; 0,3; 0,5 e 3,2 cmol_c.dm⁻³

micronutrientes y según Benett *et al.* (2011), la aplicación de nitrógeno foliar consiste en el uso de urea (u otra fuente) diluida en agua y aplicada en un sistema de aspersión. En este procedimiento, la absorción foliar de nitrógeno es más eficiente, ya que se utilizan pequeñas cantidades por hectárea de nitrógeno debido a una mayor absorción y reducción de las pérdidas de lixiviados (Aguiar *et al.*, 2006).

Así, para el maíz, es importante suplementar el nitrógeno a través de la hoja, buscando la mejor disposición de este nutriente a las plantas, especialmente en las etapas de mayor demanda nutricional por parte del cultivo.

Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar la respuesta del cultivo de maíz a la aplicación de dosis crecientes de nitrógeno vía foliar en diferentes momentos, en la complementación de la fertilización vía suelo.

Materiales y métodos

Área de estudio

El experimento se realizó en una propiedad ubicada en el municipio de Terra Nova do Norte - MT, en la latitud 10°30'55,66"S, longitud 55°09'11,01"O y altitud de 290 m. Este municipio se ubica en la región definida como Amazonia Sur, en el extremo norte del estado de Mato Grosso, Brasil. En el área de investigación se han realizado investigaciones en los últimos años con pastos, en un sistema extensivo de ganadería.

respectivamente; Matéria orgânica = 17,4 g.dm⁻³, CTC a pH_{7,00} = 4,8 cmol_c.dm⁻³; Saturação de bases (%) = 23,1.

Preparo da área e condução do experimento

O preparo do solo foi realizado no dia 15 de setembro de 2013 utilizando uma gradagem pesada e duas gradagens leves. Para a correção da acidez do solo foi utilizando calcário dolomítico (Filler, PRNT 95 %) na quantidade de 1,9 Mg.ha⁻¹, visando elevar a saturação de bases para 60 %.

A adubação de sementeira foi de 400 kg.ha⁻¹ do formulado comercial 08-28-16 e em cobertura foram aplicados 100 kg.a⁻¹ do formulado comercial 20-00-20 no estágio V3 e 100 kg.ha⁻¹ ureia (45 % de N) no estágio V5, conforme recomendação de Fancelli e Dourado Neto (2000).

A sementeira foi realizada no dia 28 de janeiro de 2014, com a utilização do híbrido 2B688 PW Dow Agrosiences, visando obter uma população final de 55.000 plantas.ha⁻¹.

As parcelas foram constituídas por 6 linhas tendo 5 m de comprimento, com espaçamento entre linhas de 0,5 m. Totalizando uma área de 15 m² cada parcela. Como área útil foram consideradas três linhas centrais, desprezando-se 0,5 m em ambas as extremidades.

Tratamentos e delineamento experimental

Os tratamentos foram instalados seguindo o delineamento em blocos casualizados, com 4 repetições, em esquema fatorial 4 x 2, sendo quatro doses de nitrogênio via foliar em complementação à adubação de cobertura e duas épocas de aplicações.

Antes del inicio del estudio se realizó un análisis químico del suelo, a una profundidad de 0-20 cm y presentó las siguientes características: pH (CaCl₂) = 4,4; P = 3,1 mg.dm⁻³; K, Ca, Mg, Al y H = 0,0084; 0,8; 0,3; 0,5 y 3,2 cmol_c.dm⁻³ respectivamente; materia orgánica = 17,4 g.dm⁻³, CTC a pH 7,00 = 4,8 cmol_c.dm⁻³; Saturación de base (%) = 23,1.

Preparación del área experimental y conducción del experimento

La preparación del suelo se realizó el 15 de septiembre de 2013 utilizando una rastra pesada y dos rastras ligeras. Para la corrección de la acidez del suelo se utilizó cal dolomítica (Filler, PRNT 95%) en la cantidad de 1,9 Mg.ha⁻¹, con el objetivo de aumentar la saturación de bases al 60 %.

La fertilización de la siembra fue de 400 kg.ha⁻¹ de una formulación comercial 08-28-16 y en cobertura 100 kg.ha⁻¹ de una formulación comercial 20-00-20 en la etapa V3 y se aplicaron 100 kg.ha⁻¹ de urea (45 % de N) en el estadio V5, según lo recomendado por Fancelli y Dourado Neto (2000).

La siembra se realizó el 28 de enero de 2014, utilizando el híbrido 2B688 PW Dow Agrosiences, con el objetivo de obtener una población final de 55.000 plantas.ha⁻¹.

Las parcelas fueron de 6 hileras de 5 m de longitud, con una separación entre hileras de 0,5 m. La superficie total de cada parcela fue de 15 m². Como área útil se consideraron tres líneas centrales, dejando una bordura de 0,5 m en ambos extremos.

Na primeira época, as aplicações foram realizadas aos 15 dias após a emergência e aos 25 dias após a primeira e na segunda época, as aplicações foram realizadas aos 25 dias após a emergência e aos 15 dias após a primeira aplicação. As doses testadas foram: 0; 250; 500 e 750 mL.ha⁻¹ do fertilizante foliar fluido Fertilis® Nitroflex, com concentração de N (21 %) prontamente disponível às plantas (N solúvel em água: 241,5 g.L⁻¹, densidade: 1.150 g.L⁻¹, pH do produto: 6.6, natureza física: fluido - suspensão heterogênea).

Para a aplicação do produto, foi utilizado um pulverizador costal manual, portando ponta de jato plano XR 110.02, trabalhando à pressão constante de 2,5 kgf.cm², mantida por CO₂, com consumo de calda de 200 L.ha⁻¹.

Variáveis analisadas

As avaliações das características vegetativas e produtivas foram realizadas, no estádio de grãos farináceos, 95 dias após a semeadura, em 10 plantas de cada parcela. Foram realizadas as seguintes determinações: altura de plantas (AP), altura da inserção da primeira espiga (AE), diâmetro de caule (DC), número de fileiras de grãos na espiga (NF), diâmetro de espiga (DE) e comprimento das espigas (CE). A AP foi determinada pela distância do solo até a folha bandeira abaixo do pendão. O DC foi determinado no segundo entrenó com auxílio de paquímetro digital Mitutoyo modelo Absolute300. NF, DE e CE foram determinados com auxílio de régua e paquímetro digital, em 10 espigas despalhadas, colhidas aleatoriamente na área útil das parcelas. Para a determinação do peso de massa verde (PMV) e seca (PMS) de

Tratamientos y diseño experimental

Se utilizó un diseño de bloques al azar, con 4 repeticiones, en un esquema factorial 4 x 2, con cuatro dosis de nitrógeno vía hoja además del abono y dos tiempos de aplicación. En la primera temporada, las aplicaciones se realizaron a los 15 días después de la emergencia y a los 25 días después de la primera y en la segunda temporada, las aplicaciones se realizaron a los 25 días después de la emergencia y a los 15 días después de la primera aplicación. Las dosis probadas fueron: 0; 250; 500 y 750 mL.ha⁻¹ de fertilizante foliar fluido Fertilis Nitroflex®, con concentración de 21 % N, fácilmente disponible para las plantas (solubilidad del N en agua: 241.5 g.L⁻¹, densidad: 1,150 g.L⁻¹, pH de producto: 6.6, naturaleza física: fluido - suspensión heterogénea).

Para la aplicación del producto se utilizó un aspersor manual de mochila, portando una punta de chorro plano XR 110.02, trabajando a una presión constante de 2.5 kgf.cm², mantenida por CO₂, con un consumo de 200 L.ha⁻¹.

Variables analizadas

Las evaluaciones de las características vegetativas y productivas se realizaron, en la etapa de granos harinosos, 95 días después de la siembra, en 10 plantas de cada parcela. Se realizaron las siguientes determinaciones: altura de la planta (AP), altura de la primera inserción de la mazorca (AE), diámetro del tallo (DC), número de hileras de granos en la mazorca (NF), diámetro de la mazorca (DE) y longitud de la mazorca (CE). Para determinar la

plantas, foram cortadas rente ao solo as plantas da área útil de cada parcela. Após o corte as plantas foram pesadas em balança eletrônica Urano modelo 20K com precisão de 0,05 g, visando a determinação de massa verde. Após o corte foram retiradas amostras de duas plantas inteiras, pesadas verdes em balança semi analítica Urano modelo UA5200 com precisão de 0,05 g e colocadas em saco de papel tipo kraft e levadas para secagem em estufa de circulação forçada de ar Tecnal modelo TE394 a ± 65 °C até atingirem massa constante. Posteriormente foram novamente pesadas para determinação do teor de umidade e a respectiva massa seca de cada repetição e realizada a conversão de massa verde em massa seca.

O índice Spad (IS) das folhas foi determinado, por ocasião do florescimento pleno, no terço médio da folha abaixo da espiga, sendo realizadas dez leituras por folha com medidor portátil SPAD- 502, da empresa Minolta. A determinação de teor foliar de nitrogênio (TFN) foi realizada conforme metodologia descrita por Malavolta *et al.* (1997).

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANAVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, sendo utilizado o software estatístico Sisvar (Ferreira, 2014).

Resultados e discussão

Para NF e DE, não ocorreram diferenças entre épocas e entre doses e também não foram observadas interações entre os fatores (Tabela 1, Figura 1 e Figura 2).

AP se midió la distancia desde el suelo hasta la hoja bandera debajo de la borla. La DC se determinó en el segundo entrenudo con la ayuda de un vernier digital Mitutoyo modelo Absolute300. Se determinaron NF, DE y CE con ayuda de regla y vernier digital, en 10 mazorcas sin pelar, recolectadas al azar en el área útil de las parcelas. Para determinar el peso de masa fresca (PMV) y peso seco (PMS) de plantas, se cortaron plantas del área útil de cada parcela cerca del suelo. Después del corte, las plantas se pesaron en una balanza electrónica modelo Urano 20K con una precisión de 0,05 g, con el fin de determinar la masa fresca. Después del corte, se tomaron muestras de dos plantas enteras, se pesaron en verde en una balanza semi-analítica Urano modelo UA5200 con una precisión de 0,05 g, y se colocaron en una bolsa de papel kraft y se llevaron a secar en una estufa de circulación de aire forzado Tecnal modelo TE394 a ± 65 °C hasta alcanzar masa constante. Posteriormente, se volvieron a pesar para determinar el contenido de humedad y la respectiva masa seca de cada repetición y se realizó la conversión de masa fresca a masa seca.

El índice Spad (IS) de las hojas se determinó, en el momento de la plena floración, en el tercio medio de la hoja debajo de la mazorca, con diez lecturas por hoja con un medidor portátil SPAD-502, de la empresa Minolta. La determinación del contenido de nitrógeno foliar (TFN) se realizó según la metodología descrita por Malavolta *et al.* (1997).

Tabela 1. Quadro de análise de variância para número de fileiras de grãos (NF), diâmetro de espigas (DE), altura de planta (AP), altura de inserção da espiga (AE), diâmetro do colmo (DC), de plantas de milho em função de doses crescentes de adubo foliar, aplicado em diferentes épocas no município de Terra Nova do Norte – MT – Brasil.

Tabla 1. Análisis de varianza para el número de filas de granos (NF), diámetro de mazorca (DE), altura de planta (AP), altura de inserción de mazorca (AE), diámetro de tallo (DC), de plantas de maíz debido a dosis crecientes de fertilizante foliar, aplicado en diferentes momentos en el municipio de Terra Nova do Norte - MT - Brasil.

	NF	DE	AP	AE	DC
Época (E) Valor F	0,004 ns	0,344 ns	4,181 ns	0,736 ns	2,349 ns
Dose (D) Valor F	0,347 ns	1,019 ns	8,467*	6,642*	5,723*
E*D Valor F	0,076 ns	1,395 ns	0,529 ns	1,271 ns	0,539 ns
C.V. (%)	11,65	6,72	9,07	12,00	11,71

ns: não significativo; *: significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F.

ns: no significativo; *: significativo al 5% de probabilidad según la prueba F.

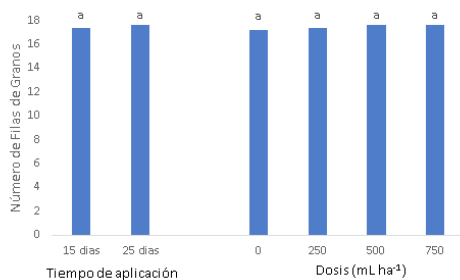


Figura 1. Número de fileiras de grãos de espigas de milho submetidas a diferentes doses de adubo foliar, aplicado em diferentes épocas no município de Terra Nova do Norte – MT – Brasil. Os traços verticais indicam erro-padrão das médias. Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Figura 2. Diâmetro de la espiga de maíz sometidas a diferentes dosis de fertilizante foliar, aplicadas en diferentes momentos en el municipio de Terra Nova do Norte - MT - Brasil. Los guiones verticales indican el error estándar de las medias. Significativo al 5% de probabilidad según la prueba de Tukey.

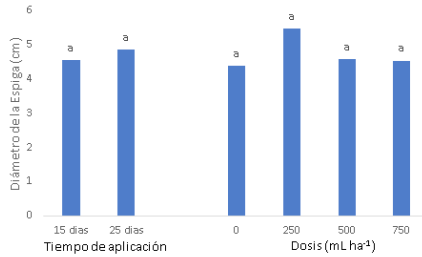


Figura 2. Diámetro de espigas de maíz submetidas a diferentes doses de adubo foliar, aplicado em diferentes épocas no município de Terra Nova do Norte – MT – Brasil. Os traços verticais indicam erro-padrão das médias. Significativo a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Figura 2. Diámetro de la espiga de maíz sometidas a diferentes dosis de fertilizante foliar, aplicadas en diferentes momentos en el municipio de Terra Nova do Norte - MT - Brasil. Los guiones verticales indican el error estándar de las medias. Significativo al 5% de probabilidad según la prueba de Tukey.

Diversos autores (Biscaro *et al.*, 2011; Tomazela *et al.*, 2006) também não verificaram efeito significativo da adubação nitrogenada no número de fileiras e no diâmetro da espiga. Essas variáveis estão estreitamente relacionadas e também são influenciadas pela genética da espécie (Goes *et al.*, 2012).

Para AP não ocorreu diferença entre as épocas de aplicação, no entanto, em relação às doses estudadas, verificou-se que à medida que a dose do fertilizante foliar era aumentada, as plantas responderam significativamente, verificando-se aumento nesta variável a partir de 500 mL.ha⁻¹ (Figura 3). Em estudo realizado por Deuner *et al.* (2008), estes também não verificaram efeito na aplicação da ureia, na concentração de 100 mL.ha⁻¹, para AP. Entretanto,

Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANAVA) y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey al 5 % de probabilidad, utilizando el software estadístico Sisvar (Ferreira, 2014).

Resultados y discusión

Para NF y DE, no hubo diferencias entre tiempos y dosis y no se observaron interacciones entre los factores de estudio (Tabla 1, Figura 1 y Figura 2)

Otros autores (Biscaro *et al.*, 2011; Tomazela *et al.*, 2006) tampoco encontraron efecto significativo de la fertilización con nitrógeno sobre el número de filas de grano y el diámetro de la mazorca. Estas variables están estrechamente relacionadas y también están influenciadas por la

estes autores, ao aumentarem a concentração para 200 mL.ha⁻¹ de ureia, verificaram-se incremento de 26 % na AP em relação à adubação somente via solo.

genética de la especie (Goes *et al.*, 2012).

Para AP no hubo diferencia entre los períodos de aplicación, sin embargo, en relación a las dosis estudiadas,

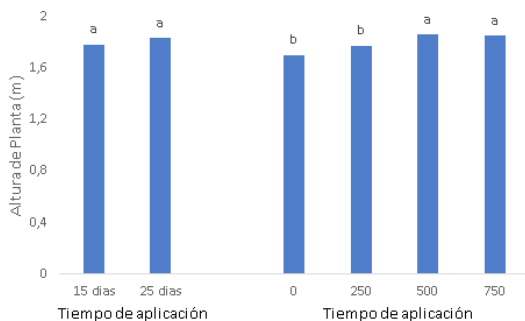


Figura 3. Altura de plantas de milho submetidas a diferentes doses de adubo foliar, aplicado em diferentes épocas no município de Terra Nova do Norte – MT – Brasil. Os traços verticais indicam erro-padrão das médias.

Figura 3. Altura de plantas de maíz sometidas a diferentes dosis de fertilizante foliar, aplicadas en diferentes momentos en el municipio de Terra Nova do Norte - MT - Brasil. Los guiones verticales indican el error estándar de las medias.

Para a AE e DC também somente ocorreu diferença entre as doses aplicadas do fertilizante foliar, onde para ambas as características apresentaram comportamento linear crescente (Figura 4 e 5). Os acréscimos das doses nitrogenadas desta pesquisa demonstraram que houve resposta de incremento das plantas de milho nestas duas variáveis, sendo que para a altura de inserção da espiga, essa diferença ocorreu a partir de 500 mL.ha⁻¹ do fertilizante (Figura 4) e para diâmetro de colmo em plantas de milho, já a partir da menor concentração (250 mL.ha⁻¹) testada, houve aumento nestes valores (Figura 5).

se encontró que a medida que se incrementó la dosis de fertilizante foliar, las plantas respondieron significativamente, con un incremento en esta variable a partir de 500 mL.ha⁻¹ (Figura 3). En un estudio de Deuner *et al.* (2008), tampoco encontraron efecto sobre la aplicación de urea, a una concentración de 100 mL.ha⁻¹, para AP. Sin embargo, estos autores, al aumentar la concentración a 200 mL.ha⁻¹ de urea, hubo un aumento de 26 % en AP en relación a la fertilización solo vía suelo.

Para AE y DC solo hubo diferencia entre las dosis aplicadas de fertilizante foliar, ambas variables presentaron

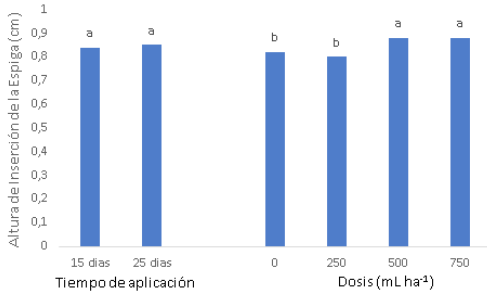


Figura 4. Altura de inserção da espiga em plantas de milho submetidas a diferentes doses de adubo foliar, aplicado em diferentes épocas no município de Terra Nova do Norte – MT – Brasil. Os traços verticais indicam erro-padrão das médias.

Figura 4. Altura de inserción de espiga en plantas de maíz sometidas a diferentes dosis de fertilizante foliar, aplicadas en diferentes momentos en el municipio de Terra Nova do Norte - MT - Brasil. Los guiones verticales indican el error estándar de las medias.

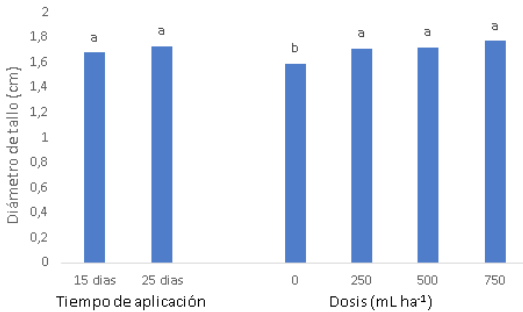


Figura 5. Diâmetro de colmo em plantas de milho submetidas a diferentes doses de adubo foliar, aplicado em diferentes épocas no município de Terra Nova do Norte – MT – Brasil. Os traços verticais indicam erro-padrão das médias.

Figura 5. Diámetro de tallo en plantas de maíz sometidas a diferentes dosis de fertilizante foliar, aplicadas en diferentes momentos en el municipio de Terra Nova do Norte - MT - Brasil. Los guiones verticales indican el error estándar de las medias

Ao contrário dos resultados obtidos no presente trabalho, Goes *et al.* (2012) não verificaram efeito significativo da adubação nitrogenada via solo ou foliar na AE e no DC; no entanto, Gazola *et al.* (2014), verificaram efeito de doses de nitrogênio via solo na AE.

O nitrogênio é integrante de todos os aminoácidos e também faz parte da constituição de proteínas e da molécula de clorofila, estando assim relacionado com o crescimento e ao rendimento das plantas, sendo indispensável para a manutenção da atividade fotossintética (Basi *et al.*, 2011).

Ocorreu efeito de doses e não houve efeito de época de aplicação do nitrogênio e interação entre doses de fertilizante foliar e época de aplicação para o IS, TFN, PMV e PMS (Tabela 2).

un comportamiento lineal creciente (Figuras 4 y 5). Los incrementos en las dosis de nitrógeno en esta investigación mostraron que hubo un aumento en la respuesta de las plantas de maíz en estas dos variables, y para la altura de inserción de la mazorca, esta diferencia se presentó a partir de 500 mL.ha⁻¹ del fertilizante (Figura 4) y para el diámetro del tallo en las plantas de maíz, a partir de la concentración más baja estudiada (250 mL.ha⁻¹) (Figura 5).

Contrariamente a los resultados obtenidos en el presente estudio, Goes *et al.* (2012) no encontraron un efecto significativo de la fertilización con nitrógeno a través del suelo o la hoja en LA y CD; sin embargo, Gazola *et al.* (2014), verificaron el efecto de las

Tabela 2. Quadro de análise de variância para índice Spad (IS), teor foliar de N (TFN), produtividade de massa verde (PMV) e produtividade de massa seca (PMS) de plantas de milho sob doses crescentes de adubo foliar, aplicado em diferentes épocas no município de Terra Nova do Norte – MT – Brasil.

Cuadro 2. Cuadro de análisis de varianza para índice de Spad (IS), contenido de hojas de N (TFN), productividad de masa fresca (PMV) y productividad de masa seca (PMS) de plantas de maíz bajo dosis crecientes de fertilizante foliar, aplicado en diferentes momentos en el municipio de Terra Nova do Norte - MT - Brasil.

	IS (Spad)	TFN (g.kg ⁻¹)	PMV (kg.ha ⁻¹)	PMS (kg.ha ⁻¹)
Época (E)Valor F	1,009 ns	0,256 ns	0,137 ns	0,312 ns
Dose (D)Valor F	7,472 *	42,962 **	14,054 **	5,492 *
E*DValor F	0,049 ns	2,503	2,191 ns	1,330 ns
C.V. (%)	17,00	6,78	10,94	12,29

ns: não significativo; *, **: significativo a 5 %, ** 1 % de probabilidade pelo teste F.

ns: no significativo; *, **: significativo al 5 %, ** 1 % de probabilidad según la prueba F.

Para IS, nota-se aumento das médias em função do aumento da dose já a partir de 250 mL.ha⁻¹ (Figura 6). Comparando-se a maior dose estudada com plantas que não receberam o tratamento com o fertilizante foliar, houve aumento de 16 % no teor de cor verde das folhas destas. Isso ocorreu pela relação existente entre o teor de N com a clorofila. Neste sentido, Argenta *et al.* (2003), comentam que o nível de N na planta de milho é correspondente ao teor de clorofila na folha, obtido pelo clorofilômetro. Resultados semelhantes também foram obtidos por Fernandes e Buzetti (2005) que verificaram que o fornecimento de nitrogênio promoveu aumentos nos conteúdos foliares de clorofila na cultura do milho.

dosis de nitrógeno a través del suelo sobre EA.

El nitrógeno es parte integral de todos los aminoácidos y también es parte de la constitución de las proteínas y la molécula de clorofila, estando así relacionado con el crecimiento y rendimiento de las plantas, siendo indispensable para el mantenimiento de la actividad fotosintética (Basi *et al.*, 2011).

El factor dosis tuvo efecto significativo para las variables IS, TFN, PMV y PMS mientras que el tiempo de aplicación de nitrógeno e interacción entre dosis de fertilizante foliar y tiempo de aplicación no lo fue significativo (Cuadro 2).

Para IS, hay un aumento en los promedios en función del

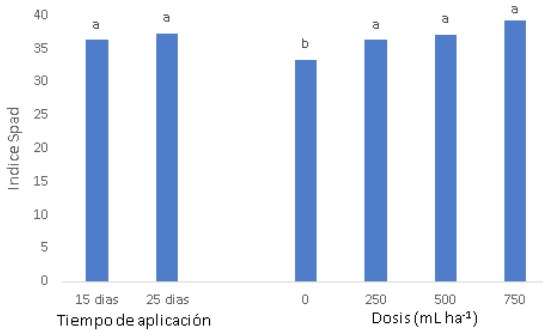


Figura 6. Teor de cor verde das folhas (índice SPAD) de plantas de milho submetidas a diferentes doses de adubo foliar, aplicado em diferentes épocas no município de Terra Nova do Norte – MT – Brasil. Os traços verticais indicam erro-padrão das médias.

Figura 6. Contenido de hoja verde (índice SPAD) de plantas de maíz sometidas a diferentes dosis de fertilizante foliar, aplicadas en diferentes momentos en el municipio de Terra Nova do Norte - MT - Brasil. Los guiones verticales indican el error estándar de las medias.

A resposta do TFN em relação a aplicação foliar do adubo nitrogenado está representada na Figura 7. De maneira similar às demais variáveis, já a partir de 250 mL.ha⁻¹, que corresponde a 52,5 g.kg⁻¹ de N, houve incremento nos valores obtidos. Segundo Malavolta *et al.* (1997), os teores foliares adequados para a cultura do milho estão entre 27,5 e 32,5 g.kg⁻¹, o que coloca todas as doses acima do nível adequado. Também, Gazola *et al.* (2014), trabalhando com adubação nitrogenada em cobertura em milho verificaram que teores inferiores ao considerado normal, não apresentavam aumento nesta variável. Plantas com maiores TFN tendem a aumentar a sua eficácia em alocar carboidratos para o sistema radicular tornando-o mais abrangente e diligente em aproveitar o N disponível (Meira *et al.*, 2009).

aumento de dosis de 250 mL.ha⁻¹ (Figura 6). Comparando la dosis más alta estudiada con plantas que no recibieron tratamiento con fertilizante foliar, hubo un aumento del 16 % en el contenido de color verde de las hojas. Esto se debió a la relación entre el contenido de N y la clorofila. En este sentido, Argenta *et al.* (2003), comentan que el nivel de N en la planta de maíz corresponde al contenido de clorofila en la hoja, obtenido por el medidor de clorofila. Fernandes y Buzetti (2005) también obtuvieron resultados similares, quienes encontraron que el suministro de nitrógeno promovía aumentos en el contenido de clorofila foliar en el cultivo de maíz.

La respuesta del TFN en relación a la aplicación foliar de fertilizante

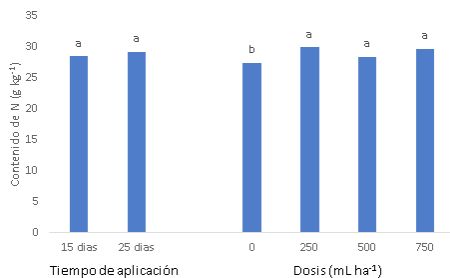


Figura 7. Teor foliar de nitrogênio em função da aplicação de adubo foliar em plantas de milho submetidas a diferentes doses de adubo foliar, aplicado em diferentes épocas no município de Terra Nova do Norte – MT – Brasil. Os traços verticais indicam erro-padrão das médias.

Figura 7. Contenido de nitrógeno foliar en función de la aplicación de fertilizante foliar en plantas de maíz sometidas a diferentes dosis de fertilizante foliar, aplicadas en diferentes momentos en el municipio de Terra Nova do Norte - MT - Brasil. Los guiones verticales indican el error estándar de las medias.

A resposta da adubação foliar com relação à PMV acompanhou uma tendência de aumento (Figura 8), onde nota-se que foi obtida a máxima resposta na maior dose testada (750 mL.ha⁻¹). Assis *et al.* (2014), trabalhando com nove híbridos de milho visando a caracterização agrônômica e bromatológica para ensilagem, verificaram PMV entre 33,47 a 42,53 Mg.ha⁻¹, estando as maiores produtividades próximas às observadas no presente trabalho. Já Athayde (2012), em trabalho para verificar o efeito da aplicação da ureia em diferentes épocas sobre o rendimento de milho para silagem verificou em função da dose valores entre 45,80 a 49,85.ha⁻¹, sendo estes superiores ao da presente pesquisa.

A PMS, de maneira similar a PMV, apresentou uma tendência crescente (Figura 9) indicando melhor resposta na maior dose testada (750 mL.ha⁻¹). As produtividades oscilaram entre 8.165 a 9.087 Mg.ha⁻¹ no presente trabalho e são inferiores às observadas por Assis *et al.* (2014), os quais verificaram valores entre 10.650 a 13.430 Mg.ha⁻¹. Meira *et al.* (2009), comentam que a cultivar de milho apresenta interferência direta na resposta à aplicação de nitrogênio, onde existem híbridos que são mais responsivos comparados a outros que não são responsivos e apresentam menor eficiência na conversão do N aplicado. A produtividade de massa também está relacionada com as condições climáticas que o milho está sujeito durante o ciclo.

A adubação foliar é complementar à adubação via solo, no que diz respeito ao fornecimento de nitrogênio, fósforo

nitrogenado se representa en la Figura 7. Al igual que las otras variables, partiendo de 250 mL.ha⁻¹, que corresponde a 52.5 g.kg⁻¹ de N, hubo un aumento en los valores obtenidos. Según Malavolta *et al.* (1997), los contenidos foliares aptos para el cultivo de maíz se encuentran entre 27,5 y 32,5 g.kg⁻¹, lo que sitúa todas las dosis por encima del nivel adecuado. Además, Gazola *et al.* (2014), trabajando con fertilización nitrogenada en cobertura de maíz, encontraron que niveles inferiores a los considerados normales, no mostraron un incremento en esta variable. Las plantas con mayor TFN tienden a aumentar su eficiencia en la asignación de carbohidratos al sistema de raíces, lo que lo hace más completo y diligente en el aprovechamiento del N disponible (Meira *et al.*, 2009).

La respuesta de fertilización foliar en relación a PMV siguió una tendencia ascendente (Figura 8), donde se observa que la respuesta máxima se obtuvo a la dosis más alta probada (750 mL.ha⁻¹). Assis y *et al.* (2014), trabajando con nueve híbridos de maíz con el objetivo de caracterización agrónómica y bromatológica para ensilaje, encontraron PMV entre 33,47 a 42,53 Mg.ha⁻¹, siendo los rendimientos más altos cercanos a los observados en el presente trabajo. Athayde (2012), por su parte, trabajando para verificar el efecto de la aplicación de urea en diferentes momentos sobre el rendimiento de maíz para ensilado encontró, según la dosis, valores entre 45.80 a 49.85 Mg.ha⁻¹, los cuales son superiores al del esta investigación.

e potássio para as culturas, onde a incorporação de nitrogênio via foliar pode auxiliar na suplementação do fornecimento via solo em determinados estágios de crescimento. O adubo aplicado via foliar pode ser rapidamente incorporado ao metabolismo para favorecer o processo de crescimento e desenvolvimento (Lima *et al.*, 2009).

El PMS, al igual que el PMV, mostró una tendencia creciente (Figura 9) que indica una mejor respuesta a la dosis más alta probada ($750 \text{ mL}\cdot\text{ha}^{-1}$). Los rendimientos variaron de 8.165 a $9.087 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ en el presente estudio y son más bajas que las observadas por Assis *et al.* (2014), que encontró valores entre 10.650 a $13.430 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$. Meira

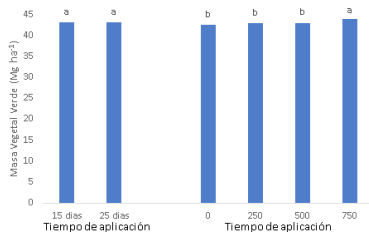


Figura 8. Matéria verde de plantas de milho submetidas a diferentes doses de adubo foliar, aplicado em diferentes épocas no município de Terra Nova do Norte – MT – Brasil. Os traços verticais indicam erro-padrão das médias.

Figura 8. Massa vegetal verde de plantas de maíz sometidas a diferentes dosis de fertilizante foliar, aplicado en diferentes momentos en el municipio de Terra Nova do Norte - MT - Brasil. Los guiones verticales indican el error estándar de las medias.

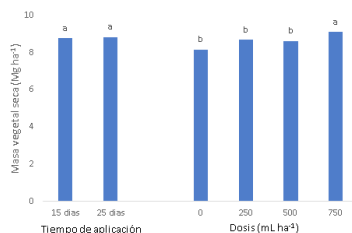


Figura 9. Matéria seca de plantas de milho submetidas a diferentes doses de adubo foliar, aplicado em diferentes épocas no município de Terra Nova do Norte – MT – Brasil. Os traços verticais indicam erro-padrão das médias.

Figura 9. Massa vegetal seca de plantas de maíz sometidas a diferentes dosis de fertilizante foliar, aplicadas en diferentes momentos en el municipio de Terra Nova do Norte - MT - Brasil. Los guiones verticales indican el error estándar de las medias.

Conclusão

Aplicação foliar de nitrogênio aumenta a produtividade de massa verde e seca do milho para silagem a partir de 750 mL.ha⁻¹ do fertilizante foliar estudado.

Não há acréscimo de fatores produtivos se a aplicação foliar de nitrogênio for parcelada.

Literatura citada

- Aguiar, M. I., I.P. Lourenco, T.S. Oliveira and N.B. Lacerda. 2006. Nutrient losses by leaching in an Ultisol with melon. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.* 10(4): 811-819.
- Argenta, G., P.R.F. Silva, E.L. Fosthofer, M.L. Strieder, E. Suhre and L.L. Teichmann. 2003. Nitrogen fertilization in maize by monitoring the plant n level by a chlorophyll meter. *Rev. Bras. Ciênc. Solo.* 27(1):109-119.
- Assis, F.B., F.C. Basso, E.C. Lara, E. Raposo, L.M.A. Bertipaglia, L.O. Fernandes, C.H.S. Rabelo and R.A. Reis. 2014. Agronomic and chemical characteristics of hybrid corn to ensiling. *Semina: Ciênc. Agrár.* 35(6):2869-2882.
- Athayde, A.A.R. 2012. Avaliação de aditivos associados na ensilagem de cana-de-açúcar *Saccharum officinarum*. *Nucleus.* 9(2):257-262.
- Basi, S., M. Neumann, F. Marafon, R.K. Ueno e I.E. Sandini. 2011. Influência da adubação nitrogenada sobre a qualidade da silagem de milho. *Rev. Bras. Tecnol. Apl. Ciênc. Agrár.* 4(2):219-234.
- Benett, C.G.S., S. Buzetti, K.S. Silva, M.C.M. Teixeira Filho, M. Andreotti and O. Arf. 2011. Leaf and sidedressing nitrogen application on wheat crop in savanna. *Semina: Ciênc. Agrár.* 32(3):829-832.
- Biscaro, G.A., A.V.A. Motomiya, R. Ranzi e M. André. 2011. Desempenho do

et al. (2009), comentan que el cultivar de maíz presenta interferencia directa en la respuesta a la aplicación de nitrógeno, donde existen híbridos que son más receptivos en comparación con otros que no responden y muestran menor eficiencia en la conversión del N aplicado. El rendimiento también está relacionado con las condiciones climáticas a las que está sujeto el maíz durante el ciclo.

La fertilización foliar es complementaria a la fertilización vía suelo, en cuanto al aporte de nitrógeno, fósforo y potasio a los cultivos, donde la incorporación de nitrógeno vía hoja puede ayudar a complementar el aporte vía suelo en determinadas etapas de crecimiento. El fertilizante aplicado vía hoja se puede incorporar rápidamente al metabolismo para favorecer el proceso de crecimiento y desarrollo (Lima *et al.*, 2009).

Conclusión

La aplicación foliar de nitrógeno aumenta la productividad de masa fresca y seca de maíz para ensilaje a partir de 750 mL.ha⁻¹ del fertilizante foliar estudiado.

No hay aumento de factores productivos si se fracciona la aplicación foliar de nitrógeno.

Fin de la Version en Español

milho safrinha irrigado submetido a diferentes doses de nitrogênio via solo e foliar. *Agrarian.* 4(11):10-19.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). 2020. Acompanhamento da safra brasileira – Grãos – v.7 – Safra 2019/20 – n.10 – Décimo levantamento

| Julho 2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>>. Acesso em: 13 jul. 2020.




- Deuner, S., R. Nascimento, L.S. Ferreira, P.G. Badinelli e R.S. Kerber. 2008. Adubação foliar e via solo de nitrogênio em plantas de milho em fase inicial de desenvolvimento. *Ciênc. Agrotec.* 32(5):1359-1365.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). 2009. Avaliação de sistemas de produção de milho na região de Sete Lagoas, MG. Circular Técnica. Embrapa: Sete Lagoas, 6 p.
- Fancelli, A.L. e D. Dourado Neto. 2000. Produção de milho. Guaíba: Agropecuária. 360 p.
- Farinelli, R. e L.B. Lemos. 2010. Produtividade e eficiência agrônômica do milho em função da adubação nitrogenada e manejo de solo. *Rev. Bras. Milho Sorgo.* 9(2):135-146.
- Fernandes, F.C.S. e S. Buzetti. 2005. Efeito de níveis de nitrogênio na produtividade de seis cultivares de milho (*Zea mays* L.). *Rev. Cient. Elet. Agron.* 4(7):1-7.
- Ferreira, D.F. 2014. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciênc. Agrotec.* 38(2):109-112.
- Gazola, D., C. Zucareli, R.R. Silva e I.C.B. Fonseca. 2014. Aplicação foliar de aminoácidos e adubação nitrogenada de cobertura na cultura do milho safrinha. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Amb.* 18(7):700-7007.
- Goes, R.J., R.A.F. Rodrigues, O. Arf e R.G. Vilela. 2012. Nitrogênio em cobertura para o milho (*Zea mays* L.) em sistema plantio direto na safrinha. *Rev. Bras. Milho e Sorgo.* 11(2):169-177.
- Lima, M.G.S., C.R. Mendes, R. Nascimento, N.F. Lopes e M.A.P. Carvalho. 2009. Avaliação bioquímica de plantas de milho pulverizadas com uréia isolada e em associação com aminoácidos. *Rev. Ceres.* 56(3):358-363.
- Malavolta, E., G.C. Vitti e S.A. Oliveira. 1997. Avaliação do estado nutricional de plantas: Princípios e aplicações. Piracicaba, Potafos. 308 p.
- Meira, F.A., S. Buzetti, M. Andreotti, O. Arf, M.E. Sá e J.A.C. Andrade. 2009. Fontes e épocas de aplicação do nitrogênio na cultura do milho irrigado. *Semina: Ciênc. Agrár.* 30(2):275-284.
- Pereira, B.M. 2013. Avaliação da qualidade da silagem de híbridos de milho (*Zea mays* L.) cultivados no Distrito Federal. Universidade de Brasília. Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. 28 p.
- Scivittaro, W.B., D.R.N. Gonçalves, M.L.C. Vale e V.G. Ricordi. 2010. Perdas de nitrogênio por volatilização de amônia e resposta do arroz irrigado à aplicação de ureia tratada com o inibidor de urease NBPT. *Ciênc. Rural.* 40(6):1283-1289.
- Silva, A.A., T.S. Silva, A.C.P. Vasconcelos e R.M.Q. Lana. 2012. Aplicação de diferentes fontes de ureia de liberação gradual na cultura do milho. *Biosci. J.* 28(1):104-111.
- Tomazela, A.L., J.L. Favarin, A.L. Fancelli, T.N. Martin, D. Dourado Neto e A.R. Reis. 2006. Doses de nitrogênio e fontes de Cu e Mn suplementar sobre a severidade da ferrugem e atributos morfológicos do milho. *Rev. Bras. Milho Sorgo.* 5(2):192-201.
- Yamada, T. 1996. Adubação nitrogenada do milho: quanto, como e quando aplicar? Piracicaba: Potafos, 5 p.

Micropropagation of *Pelargonium odoratissimum* (L.) L'Her. through petioles and leaves

Micropropagación de *Pelargonium odoratissimum* (L.)
L'Her., a través de explantes de hojas y pecíolos

Micropropagação de *Pelargonium odoratissimum* (L.)
L'Her. através de pecíolos e folhas

Asghar Ebrahimzadeh^{1,*}, Maliheh Fathollahzadeh²,
Mohammad Bagher Hassanpouraghdam^{3, 4} and Mohammad
Ali Aazami Mavaloo⁵

¹Assitant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Iran. Email: acebrahimzadeh@gmail.com, . ²Former Master student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Iran. Email: f_malihe@yahoo.com. ³Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Iran. Email: hassanpouraghdam@gmail.com, . ⁴Islamic Parliament Research Center, Tehran, Iran. ⁵Assitant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Iran. Email: aazami58@gmail.com, .

Abstract

Pelargonium odoratissimum (L.) L'Her is a hard rooting plant and the common methods of propagation *via* stem cuttings are not successful with this species. therefore, tissue culture methods have been experienced for the mass-propagation of this high-valued species. Intact leaves, leaf segments and petiole sections derived from nodal explants *in vitro* were employed for the optimization of *P. odoratissimum* micropropagation. The treatment combinations used were MS and 1/2 MS media supplemented with 6-benzylaminopurine, BAP (1, 1.5, 2 and 4.5 mg.L⁻¹) and 1-naphthaleneacetic acid, NAA (0.1, 1 and 1.5 mg.L⁻¹). With leaf segments, the lowest browning incidence, the greatest callogenesis and the highest number of shoots were obtained with the media containing 1.5 mg.L⁻¹ BAP and 1 mg.L⁻¹ NAA. Two mg.L⁻¹ BAP + 0.1 mg.L⁻¹ NAA kept the same results for petiole explants. Intact leaves showed the best results for the three mentioned

Recibido el 23-03-2020 • Aceptado el 04-07-2020.

*Corresponding autor. Email: acebrahimzadeh@gmail.com, ebrahimzadeh@maragheh.ac.ir

treatments with 1 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ NAA. 0.2 mg.L⁻¹ NAA caused the highest rooting percentage and the greatest mean data for the number and length of the roots. Rooted plantlets were transferred to the pots containing 1:1 peat-moss and perlite. Acclimatization of the plantlets was followed by 90 % of survival rate in the greenhouse. The protocol employed would be a potent one to present for the extension section.

Keyword: nodal explants, MS medium, shoot organogenesis, BAP, NAA, leaf segments.

Resumen

Pelargonium odoratissimum (L.) L'Her es una planta de complejo enraizamiento y los métodos comunes de propagación mediante esquejes de tallos no presentan un resultado positivo con esta especie. Acorde a lo anterior, han realizado ensayos empleando métodos de cultivo de tejidos para la propagación a gran escala de esta especie de alto valor. Se emplearon: hojas completas, segmentos de hojas y secciones de pecíolo; derivadas de explantes nodales producidos *in vitro* para la optimización de la micropropagación de *P. odoratissimum*. Las combinaciones de tratamiento utilizadas fueron: MS y 1/2 MS enriquecidos con 6-bencilaminopurina, BAP (1, 1.5, 2 y 4.5 mg.L⁻¹) y ácido naftalenacético, NAA (0.1, 1 y 1.5 mg.L⁻¹). Al utilizar segmentos foliares, se observó menor incidencia de pardeamiento y mayor callogénesis. El mayor número de brotes se obtuvo con el medio de cultivo que contenía 1,5 mg.L⁻¹ BAP y 1 mg.L⁻¹ NAA. Los medios de cultivo de 2 mg.L⁻¹ BAP + 0.1 mg.L⁻¹ NAA, presentaron los mismos resultados para los explantes de pecíolo. Las hojas completas mostraron los mejores resultados el emplear el medio de 1 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ NAA. El tratamiento de 0.2 mg.L⁻¹ NAA causó el mayor porcentaje de enraizamiento y la mayor media de datos para el número y longitud de raíces. Las plántulas enraizadas se transfirieron a materas utilizando como sustrato una mezcla de turba-musgo y perlita, con una relación de mezcla 1:1. El acondicionamiento de las plántulas presentaron una tasa de supervivencia 90 % en el invernadero. El protocolo empleado presento altas tasas de efectividad como medio de propagación para su extensión.

Palabras clave: explantes nodales, MS, organogénesis de brotes, BAP, NAA, segmentos foliares.

Resumo

Pelargonium odoratissimum (L.) L'Her é uma planta de enraizamento difícil e os métodos comuns de propagação por meio de estacas não têm sucesso com esta espécie. Portanto, métodos de cultura de tecidos têm sido experimentados para a propagação em massa desta espécie de alto valor. Folhas intactas, segmentos foliares e seções de pecíolo derivados de explantes nodais *in vitro* foram empregados para a otimização da micropropagação de *P. odoratissimum*. As combinações de tratamento utilizadas foram meio MS e 1/2 MS suplementado com 6-benzilaminopurina, BAP (1, 1,5, 2 e 4,5 mg.L⁻¹) e ácido 1-naftalenoacético, NAA

(0,1, 1 e 1,5 mg.L⁻¹). Nos segmentos foliares, a menor incidência de escurecimento, a maior calogênese e o maior número de brotações foram obtidos com os meios contendo 1,5 mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de ANA. Dois mg.L⁻¹ de BAP + 0,1 mg.L⁻¹ de NAA mantiveram os mesmos resultados para explantes de pecíolo. As folhas intactas apresentaram os melhores resultados para os três tratamentos citados com 1 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ ANA. 0,2 mg.L⁻¹ NAA causou a maior porcentagem de enraizamento e os maiores dados médios para o número e comprimento das raízes. As plântulas enraizadas foram transferidas para vasos contendo turfa-musgo 1: 1 e perlita. A aclimação das mudas foi acompanhada por 90% de sobrevivência em casa de vegetação. O protocolo empregado seria potente para apresentar para a seção de extensão.

Palavras-chave: explantes nodais, meio MS, organogênese caulinar, BAP, NAA, segmentos foliares.

Introduction

Pelargonium odoratissimum (L.) L'Her. belongs to the Geraniaceae family (Hassanein and Dorion, 2005). Essential oil of this species is widely used in fragrance, hygienic and cosmetic industries. Furthermore, the oil holds antimicrobial, antifungal and insecticidal activities (Gupta *et al.*, 2002). *P. odoratissimum* is considered a hard-to-root species that is not successfully multiplied when methods of propagation *via* stem cuttings, commonly used in other *Pelargonium* species, are applied (Bhuse *et al.*, 2003). Therefore, tissue culture methods have been completed for the mass-propagation of this high-valued species (Gupta *et al.*, 2002). Diverse plant organs have been utilized as micropropagation propagules (Gupta *et al.*, 2002). Shoot organogenesis has been successful with different *Pelargonium* species via direct (Dunbar and Stephens, 1989) or indirect (callogenesis) procedures (Boase *et al.*, 1998; Agarwal and

Introducción

Pelargonium odoratissimum (L.) L'Her. pertenece a la familia Geraniaceae (Hassanein y Dorion, 2005). El aceite esencial de esta especie es ampliamente utilizado en las industrias de fragancias, higiene y cosméticos. Adicionalmente el aceite, se le atribuye propiedades antimicrobianas, antifúngicas e insecticida (Gupta *et al.*, 2002). *Pelargonium odoratissimum* se considera una especie de complejo enraizamiento y bajo éxito en los métodos de propagación a través de esquejes de tallo, empleados comúnmente en otras especies de *Pelargonium* (Bhuse *et al.*, 2003). Esta problemática, ha generado el desarrollo de métodos de cultivos de tejidos para la propagación masiva de esta especie de alto valor industrial (Gupta *et al.*, 2002). Diversos órganos vegetales se han utilizado como propágulos en micropropagación (Gupta *et al.*, 2002). La organogénesis del brote ha tenido éxito con

Ranu, 2000). Wojtania *et al.* (2004) reported the highest shoot organogenesis from petiole segments in 'Bonete' (a hybrid of *Pelargonium* × *hederaefolium*) using a medium containing 2 mg.L⁻¹ Thidiazuron (TDZ) and 0.1 - 0.2 mg.L⁻¹ indole-3-butyric acid (IBA). Furthermore, shoot proliferation from leaf and petioles of *P. graveolens* was achieved in the Linsmaier and Skoog (LS) medium enriched with 1 mg.L⁻¹ of 1-naphthaleneacetic acid (NAA) and 5 mg.L⁻¹ of 6-benzylaminopurine (BAP) (Ghanem *et al.*, 2008). In another study, Hassanein and Dorion (2005) reported that 1 mg.L⁻¹ Zeatin + 1 mg.L⁻¹ BAP + 0.5 mg.L⁻¹ NAA were the growth regulator combination for the highest shoot organogenesis rate in *P. graveolens* cv. "Bois joly". Regarding root organogenesis, the highest rooting percentage was induced on half-strength Murashige y Skoog (MS) medium supplemented with 1 mg.L⁻¹ indolacetic acid (IAA) (Hassanein and Dorion, 2005). Rao (1994) documented that 0.1 mg.L⁻¹ NAA was the best treatment for the optimum rooting treatments in *Pelargonium*. In another study, 90 % of the shoots produced roots after 15 days on a medium containing 0.1 mg.L⁻¹ IBA (Tembe and Deodhar, 2010). Moreover, Desilets *et al.* (1993) reported that the roots emerged easily in a hormone free 1/2 strength MS medium. The main purpose of the present study was to formulate an efficient *in vitro* propagation protocol for *P. odoratissimum* from leaf and petiole sections and intact leaf.

diferentes especies de *Pelargonium* a través de procedimientos directos (Dunbar y Stephens, 1989) o indirectos (callogénesis) (Boase *et al.*, 1998; Agarwal y Ranu, 2000). Wojtania *et al.* (2004), reportaron la mayor organogénesis de brotes a partir de segmentos de pecíolos en 'Bonete' (un híbrido de *Pelargonium* X *hederaefolium*) empleando un medio de cultivo de: 2 mg.L⁻¹ Tidiazuron (TDZ) y 0,1 - 0,2 mg.L⁻¹ de ácido indobutírico (IBA). Otros estudios, obtuvieron proliferación de brotes de hojas y pecíolos de *P. graveolens* empleado medio enriquecido de Linsmaier y Skoog (LS) con 1 mg.L⁻¹ ácido 1-naftaleacético (NAA) y 5 mg.L⁻¹ 6-benzilaminopurina (BAP) (Ghanem *et al.*, 2008). Hassanein y Dorion (2005) obtuvieron que 1 mg.L⁻¹ Zeatin + 1 mg.L⁻¹ BAP + 0,5 mg.L⁻¹ NAA, fue la combinación de reguladores de crecimiento para obtener la tasa más alta de organogénesis de brote en *P. graveolens* cv. "Bois joly". En cuanto a la organogénesis de la raíz, el porcentaje de enraizamiento más alto se indujo con el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) a la mitad de su concentración suplementado con 1 mg.L⁻¹ ácido indolacético (IAA) (Hassanein y Dorion, 2005). Rao (1994) documentó que 0,1 mg.L⁻¹ NAA fue el mejor tratamiento para los tratamientos de enraizamiento óptimos en pelargonio. En otro estudio, el 90 % de los brotes produjeron raíces después de 15 días en un medio con contenido de 0,1 mg.L⁻¹ IBA (Tembe y Deodhar, 2010). Por otra parte, Desilets *et al.* (1993) concluyó que las raíces emergieron fácilmente en

Materials and methods

Plant material and superficial sterilization

Intact leaves, petiole and leaf segments were chosen from *in vitro* derived shoots. *In vitro* mother plants were initiated from nodal-cuttings excised from plants grown in a greenhouse. Superficial sterilization of nodal cuttings was completed in a laminar-airflow cabinet as followed: immersion in 70 % ethanol for one minute, followed by sodium hypochlorite 15 % containing 2 drops of Triton X-100 for 13 minutes. Thereafter, the explants were three-times rinsed in distilled water and then were treated with 70 % alcohol for 20 seconds. The nodal cuttings were cultured in Murashige and Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) medium, and after about one month, the new shoots were chosen for the current study explants.

Media and shoot proliferation

The basal medium was MS supplemented with 3 % sucrose, 0.7 % agar and 500 mg.L⁻¹ myo-inositol. Leaf and petiole segments were cut into 0.5 cm sections under a laminar airflow cabinet. Intact leaf samples were leaves with about 1 cm in diameter. The explants were cultured in 1/2 strength MS medium containing BAP (1, 1.5, 2 and 4.5 mg.L⁻¹) and NAA (0.1, 1 and 1.5 mg.L⁻¹) as treatment combinations. To prevent tissue browning 50 mg.L⁻¹ ascorbic acid was added to the medium. Medium pH was adjusted at 5.6 - 5.7 before autoclaving at 121 °C for 20 minutes. Three explants were placed in each 9-cm petri-dish. The cultures

un medio de cultivo de 1/2 MS libre de hormona. El objetivo principal del presente estudio fue formular un protocolo de propagación *in vitro* eficiente para *P. odoratissimum* empleando secciones de hojas y pecíolos, y hojas completas.

Material y métodos

Material vegetal y esterilización superficial

Las hojas completas, las secciones de pecíolo y de hojas fueron elegidos de brotes cultivados *in vitro*. Las plantas madre cultivadas *in vitro* provienen de cortes nodales de plantas cultivadas en invernadero. La esterilización superficial de esquejes nodales se realizó en una cabina laminar con flujo de aire empleando: inmersión en etanol al 70 % durante un minuto, seguida de hipoclorito sódico 15 % que contiene 2 gotas de Tritón X-100 durante 13 minutos. A partir de entonces, los explantes se limpiaron tres veces en agua destilada y posteriormente fueron tratados con 70 % de alcohol durante 20 segundos. Los esquejes nodales se cultivaron en el medio de Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), y después de aproximadamente un mes, los nuevos brotes fueron elegidos para los explantes de estudio actuales.

Medio de cultivo y proliferación de brotes

El medio inicial fue el MS suplementado con 3 % de sacarosa, 0,7 % de agar y 500 mg.L⁻¹ mioinositol. Los segmentos de hojas y pecíolos se cortaron en secciones de 0,5 cm bajo una cabina de flujo laminar.

were placed under dark conditions for two weeks, followed by 16:8 hour photoperiod regime at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ and $20 \pm 1^\circ\text{C}$, respectively.

Four weeks after the explants were initiated, crispy and creamy calli developed. Callus formation percentage was measured for each explant. Calli were sub-cultured on the above described medium means MS + all BAP and NAA combinations. Two weeks later, shoots noticed. About two more weeks later, the number and length of the shoots were recorded.

Rooting

The shoots (3 - 4 cm) were excised and placed on $1/2$ strength MS medium containing 0.1 or 0.2 mg.L^{-1} NAA and 2 mg.L^{-1} active charcoal. The number and length of the roots were recorded two weeks later.

Acclimatization

After removing the adhered agar from the roots using 50°C water, the rooted shoots (3 - 4 cm) were transferred to the pots containing 1:1 peat - moss: perlite. Rooted cuttings were placed in growth chambers with 16:8 photoperiod at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ and $20 \pm 1^\circ\text{C}$, respectively.

Statistical analysis

This experiment was conducted as factorial experiments arranged in a complete block design with 18 treatment combinations (3 explant types \times 6 Plant Growth Regulator (PGR) combinations) with 5 replications in each experimental unit. Each experiment was repeated at least twice and the reported data are the means of two experiments. Data analyses was performed using IBM SPSS software (version 21) (SPSS,

Las muestras de hojas intactas correspondían aproximadamente a hojas de 1 cm de diámetro. Los explantes se cultivaron en un medio de $1/2$ MS que contenía combinaciones de BAP (1; 1,5; 2 y 4,5 mg.L^{-1}) y NAA (0,1; 1 y 1,5 mg.L^{-1}) como tratamientos. Para prevenir el pardeamiento de tejidos, se añadió 50 mg.L^{-1} de ácido ascórbico al medio. El pH de medio se ajustó a 5,6 - 5,7 antes de autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Se colocaron tres explantes de 9 cm en cada placa de Petri bajo condiciones de oscuridad durante dos semanas, seguidas por un régimen de fotoperiodo de 16:8 horas a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y $20 \pm 1^\circ\text{C}$, respectivamente.

Cuatro semanas después de que se iniciaran los explantes, se desarrollaron callos crujientes y cremosos. Se midió el porcentaje de formación del callo para cada explante. Los callos fueron sub-cultivados en cada medio de cultivo o tratamiento descrito anteriormente (MS + combinaciones de BAP y NAA). Dos semanas después, se evidenciaron brotes que posteriormente a las dos semanas más tarde, se registraron el número y la longitud de los brotes presentes.

Enraizamiento

Los brotes (3 - 4 cm) fueron extraídos y colocados en un medio de $1/2$ MS que contiene 0,1 o 0,2 mg.L^{-1} NAA y 2 mg.L^{-1} de carbón activado. El número y la longitud de las raíces se registraron dos semanas más tarde.

Aclimatación

Después de retirar el agar adherido de las raíces usando agua a 50°C , los brotes enraizados (3 - 4 cm)

2012). Mean comparison were carried out by LSD at 5 % probability level.

Results and discussion

Callogenesis

Calli developed from the explants incubated in the dark during 4 weeks on $\frac{1}{2}$ strength MS medium supplemented with BAP and NAA at different concentration combinations. ANOVA results showed that PGR combinations (BAP + NAA) as well explant type, and their interactions affected the callogenesis, significantly ($p < 0.01$). The results showed that intact leaf explants with 1.5 mg.L^{-1} BAP + 1 mg.L^{-1} NAA, petiole explants with 2 mg.L^{-1} BAP + 0.1 mg.L^{-1} NAA, all three explant types with 1.5 mg.L^{-1} BAP + 1 mg.L^{-1} NAA treatment combinations as well as the intact leaf and leaf segments with 4.5 mg.L^{-1} BAP + 1 mg.L^{-1} NAA treatment had maximum callus percentage but there was not significant difference among them (table 1). Therefore, the 1.5 mg.L^{-1} BAP + 1 mg.L^{-1} NAA combination would be an appropriate treatment for callus proliferation in this species regardless the explant type. Callogenesis is dependent upon the internal and external concentrations of PGRs (Benazir *et al.*, 2013). So, a suitable concentration of auxins and cytokinins is necessary to have reasonable callus formation as initial *in vitro* propagation stage. In *Pelargonium rapaceum*, Sukhumpinij *et al.* (2010) reported that callus production was optimum using leaf explants in a medium

se sembraron en macetas con sustrato 1:1 turba - musgo: perlita. Los esquejes enraizados se colocaron en cámaras de crecimiento con fotoperiodo 16:8 a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y $20 \pm 1^\circ\text{C}$, respectivamente.

Análisis estadístico

Este experimento se llevó a cabo como factorial de bloques al azar de 18 tratamientos (3 tipos de explantes \times 6 combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal (PGR)) con 5 repeticiones en cada unidad experimental. Cada experimento se repitió dos veces y los datos obtenidos son la media de dos experimentos. Los análisis de datos se realizaron utilizando el software IBM SPSS (versión 21) (SPSS, 2012). La comparación media se llevó a cabo por LSD en un nivel de probabilidad del 5 %.

Resultados y discusión

Calogénesis

Los callos se desarrollaron a partir de los explantes incubados en la oscuridad durante 4 semanas en medio de $\frac{1}{2}$ MS suplementado con BAP y NAA en diferentes combinaciones de concentración. Los resultados de ANOVA mostraron que las combinaciones de PGR (BAP + NAA) así como el tipo de explante, y sus interacciones afectaron a la calogénesis, significativamente ($p < 0.01$). Los resultados mostraron que los explantes de hojas completas con $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + 1 mg.L^{-1} NAA, explantes de pecíolo con 2 mg.L^{-1} BAP + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ NAA, los tres tipos de explantes con 1.5 mg.L^{-1} BAP + 1 mg.L^{-1} NAA combinaciones de tratamientos, así como los segmentos de hoja y

enriched with 0.1 mg.L⁻¹ BAP + 0.1 mg.L⁻¹ NAA. Furthermore, Gharib (2005) demonstrated that callus formation and organogenesis in

hoja completa con 4,5 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.NAA L⁻¹ presentaron porcentajes máximos de formación de callos, pero no había diferencia significativa

Table 1. Mean comparison for the effects of explant type and BAP-NAA combinations on callogenesis and shoot organogenesis in *Pelargonium odoratissimum*.

Cuadro 1. Comparación de los efectos de las combinaciones de tipo de explante y BAP-NAA en la calogénesis y organogénesis de broto en *Pelargonium odoratissimum*.

Explant	Study factor				Means	
	BAP mg.L ⁻¹	NAA mg.L ⁻¹	Browning (%)	Callogenesis (%)	Mean shoot number	Mean shoot length(cm)
Intact leaf	1	1	32.3 ^{efg}	100 ^a	15 ^{ab}	2.5 ^{abc}
Intact leaf	1.5	1	16.3 ^g	100 ^a	10.6 ^{cd}	3 ^{ab}
Intact leaf	1.5	1.5	15.3 ^g	86.4 ^{abc}	12.5 ^{bcd}	3.194 ^a
Intact leaf	2	0.1	39.9 ^{def}	73.6 ^{bcd}	8.16 ^{de}	2.1 ^{bcd}
Intact leaf	2	1	22.9 ^{fg}	100 ^a	13.84 ^{bc}	3 ^{ab}
Intact leaf	4.5	1	28.6 ^{efg}	93.2 ^{ab}	8.9 ^{cde}	3.46 ^a
Leaf segments	1	1	71 ^{abc}	39.6 ^{fg}	2.1 ^f	0.9 ^{ef}
Leaf segments	1.5	1	12.3 ^g	100 ^a	19.92 ^a	3 ^{ab}
Leaf segments	1.5	1.5	73 ^{abc}	36 ^{fg}	2 ^f	0.55 ^{ef}
Leaf segments	2	0.1	42.64 ^{def}	79 ^{abcd}	9.16 ^{cde}	2.5 ^{abc}
Leaf segments	2	1	46.5 ^{dc}	66.58 ^{cde}	5.29 ^{ef}	2 ^{cd}
Leaf segments	4.5	1	33.3 ^{efg}	100 ^a	11.7 ^{bcd}	2.42 ^{abc}
petiole	1	1	58.9 ^{bcd}	73 ^{bcd}	4.36 ^{ef}	1.2 ^{def}
petiole	1.5	1	40.6 ^{def}	93.2 ^{ab}	2.78 ^f	1.35 ^{de}
petiole	1.5	1.5	79.3 ^{ab}	45.6 ^{efg}	1.78 ^f	0.456 ^{ef}
petiole	2	0.1	15.3 ^g	100 ^a	19.1 ^a	3.3 ^a
petiole	2	1	92.6 ^a	25.32 ^g	0.66 ^f	0.21 ^f
petiole	4.5	1	56.38 ^{cd}	59.6 ^{def}	2 ^f	1.12 ^{ef}

Different letters indicate significant difference within each column based on LSD test at p<0.05; NAA = 1-naphthaleneacetic acid; BAP = 6-Benzylaminopurine.

Diferentes letras indican una diferencia significativa dentro de cada columna basada en la prueba de LSD en p<0.05; NAA = 1-Acido naftalenacético; BAP = 6-Benzilaminopurina.

P. nervosum occurred on a medium supplemented with 5 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ NAA.

For the prevention of explant browning *in vitro*, the culture media was supplemented with 50 mg.L⁻¹ ascorbic acid. Desilets *et al.* (1993) reported that in *P. hortorum*, browning was reduced by using half concentration of macro-nutrients and lower concentration than 2.2 mg.L⁻¹ of BAP and NAA. Table (1) shows that the lowest browning rate in leaf segments was achieved in the medium containing 1.5 and 4.5 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ NAA with petiole, 2 mg.L⁻¹ BAP + 0.1 mg.L⁻¹ NAA and, in intact leaf samples all the BAP and NAA combinations excluding 2 mg.L⁻¹ BAP + 0.1 mg.L⁻¹ NAA had the least percentage of explants with browning. In short, results showed that the intact leaf as well leaf segments slightly affected by oxidation process, whereas, petiole explants was more susceptible to oxidation. Arshad *et al.* (2012) reported that the highest survival rate in *P. capitatum* was obtained in the medium containing 2 mg.L⁻¹ BA + 1 or 2 mg.L⁻¹ NAA. Saxena *et al.* (2000) reported that using 0.5 mg.L⁻¹ BAP instead of kinetin + 0.1 mg.L⁻¹ NAA increased the survival rate in *P. graveolens* leaf explants.

Conversely, 1,5 and 2 mg.L⁻¹ BAP + 1,5 and 1 mg.L⁻¹ NAA with petiole explants and 1 and 1,5 mg.L⁻¹ BAP and NAA with leaf segments possessed the highest browning rate and hence, imposed negative effects on the growth and development of shoots and greatly reduced the survival rate. Overall, with all used PGR

entre ellos (cuadro 1). Por lo tanto, el 1,5 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ NAA combinación sería un tratamiento adecuado para la proliferación de callos en esta especie independientemente del tipo del explante. La callogénesis depende de las concentraciones internas y externas de los PGR (Benazir *et al.*, 2013). Por lo tanto, una concentración adecuada de auxinas y citoquinas es necesaria para tener una formación razonable de callos como etapa inicial de propagación *in vitro*. En *Pelargonium rapaceum*, Sukhumpinij *et al.* (2010) informaron que la producción de callos era óptima utilizando explantes de hojas en un medio enriquecido con 0,1 mg.L⁻¹ BAP + 0,1 mg.L⁻¹ NAA. Además, Gharib (2005) demostró que la formación del callos y la organogénesis en *P. nervosum* ocurrieron en un medio complementado con 5 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ NAA.

Para la prevención del pardeamiento en los explantes *in vitro*, los medios de cultivo se complementaron con 50 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico. Desilets *et al.* (1993) informaron que en *P. hortorum*, el pardeamiento se redujo mediante el uso de la concentración media de macronutrientes y una concentración menor que 2,2 mg.L⁻¹ de BAP y NAA. El cuadro (1) muestra que la tasa de pardeamiento más baja en los segmentos de hoja se alcanzó en el medio que contiene 1,5 y 4,5 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ NAA con pecíolo, 2 mg.L⁻¹ BAP + 0,1 mg.L⁻¹ NAA y, en las muestras de hojas completas, todas las combinaciones de BAP y NAA, excepto 2 mg.L⁻¹ BAP + 0,1 mg.L⁻¹ NAA tenía el menor porcentaje

combinations, intact leaf samples had the highest survival rate. This is the first report of using intact leaves from *in vitro* propagules. It seems that the great callus proliferation potential and survival rate of intact leaf might be related internal hormonal balance, the lack of injury to the leaf blade and hence, the low incidence of oxidation of phenolic compounds (Skoog and Miller, 1957).

Shoot proliferation

ANOVA results revealed that the shoot mean number was affected by treatments ($p < 0.01$), but shoot mean length was not significantly affected by them. For shoot proliferation (table 1), the calli derived from all the explants were sub-cultured on $1/2$ MS medium supplement by BAP and NAA combinations. After two weeks, developing shoots were noticeable. The responses in shoot production were different for the diverse treatment combinations. Petiole explants cultured on medium containing 2 mg.L^{-1} BAP + 0.1 mg.L^{-1} NAA, intact leaf on 1 mg.L^{-1} BAP + 1 mg.L^{-1} NAA and leaf segments grown on 1.5 mg.L^{-1} BAP + 1 mg.L^{-1} NAA had the significantly highest shoot numbers (19.1, 15, and 19.92, respectively). No significant differences were determined among these treatments. Hassanein and Dorion (2005) reported the highest shoot number from the leaf segments of *P. capitatum* and *P. graveolens* cultured in a $1/2$ MS medium containing 0.5 mg.L^{-1} NAA + 1 mg.L^{-1} BAP and zeatin. Zhou *et al.* (2007) noted that leaf segments and petiole explants produced the high number of shoots in a medium enriched with 1 mg.L^{-1}

de explantes con pardeamiento. En resumen, los resultados mostraron que los segmentos de hojas completas, así como los segmentos de hoja ligeramente afectados por el proceso de oxidación, mientras que, los explantes de pecíolo eran más susceptibles a la oxidación. Arshad *et al.* (2012) informaron que la tasa de supervivencia más alta en *P. capitatum* se obtuvo en el medio que contiene 2 mg.L^{-1} BA + 1 o 2 mg.L^{-1} NAA. Saxena *et al.* (2000) informaron que usando $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP en lugar de kinetina + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ NAA aumentó la tasa de supervivencia en los explantes de hojas de *P. graveolens*.

Por el contrario, $1,5$ y 2 mg.L^{-1} BAP + $1,5$ y 1 mg.L^{-1} NAA con explantes de pecíolo y 1 y $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP y NAA con segmentos de hoja presentaron la tasa de pardeo más alta y por lo tanto, efectos negativos en el crecimiento y desarrollo de brotes y redujo en gran medida la tasa de supervivencia. En general, con todas las combinaciones de PGR usadas, las muestras de hojas completas tenían la tasa de supervivencia más alta. Este es el primer informe de uso de hojas completas en la propagación *in vitro*. Parece que el gran potencial de proliferación del callo y la tasa de supervivencia de la hoja intacta podrían estar relacionados con el equilibrio hormonal interno, la falta de daño a la hoja y, por lo tanto, la baja incidencia de oxidación de compuestos fenólicos (Skoog y Miller, 1957).

Proliferación de brotes

Los resultados de ANOVA revelaron que el promedio de brotes se vió afectado por los tratamientos

BAP + 1 mg.L⁻¹ NAA. However, due to our results, it seems that intact leaves yielded more mean shoot number in proliferation of *P. odoratissimum*. According to the findings of Zuraida *et al.* (2013), using 3-5 mg.L⁻¹ BAP reduced the shoot proliferation in *Pelargonium* species. Therefore, for the suitable proliferation, we need a defined concentration of cytokinins. According to table 1 petiole developed the shortest shoots on all PGR combinations except 2 mg.L⁻¹ BAP + 0.1 mg.L⁻¹ NAA, shoots from leaf segments with 1.5, 2 and 4.5 mg.L⁻¹ BAP + 0.1 and 1 mg.L⁻¹ NAA and intact leaf samples in all treatment combinations except 2 mg.L⁻¹ BAP + 0.1 mg.L⁻¹ NAA had tallest shoots, with no significant differences among them. Accordingly, the longest shoots in leaf sections and petiole of *P. odoratissimum* belonged to the medium containing 1 mg.L⁻¹ NAA + 5 mg.L⁻¹ BAP (Ghanem *et al.*, 2008).

Brown and Charlwood (1986) demonstrated that the induction and subsequent elongation of adventitious shoots were dependent upon the different factors such as type and concentration of PGRs especially auxins and cytokinins. Therefore, high cytokinin to auxin ratio is the factor that affects the proliferation and shoot length in *Pelargonium* species (Brown and Charlwood, 1986; Dunbar and Stephens, 1989). High cytokinin and low auxin rates led to increased shoot formation and elongation. Auxin endogenous rates surely affect the phenomenon. It has been reported by former authors where they noted that high cytokinin rates improves the

($p < 0,01$), pero la longitud promedio del brote no se afecta significativamente por ellos. Para la proliferación de brotes (cuadro 1), los callos derivadas de todos los explantes fueron subcultivados en suplemento medio de $\frac{1}{2}$ MS por combinaciones de BAP y NAA. Después de dos semanas, los desarrollos de brotes se notaron. Las respuestas en la producción de brotes fueron diferentes para las diversas combinaciones de tratamiento. Los explantes de pecíolo cultivado en medio de cultivo que contenían 2 mg.L⁻¹ BAP + 0,1 mg.L⁻¹ NAA, hoja completa y 1 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ NAA y segmentos de hoja cultivados y 1.5 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ NAA presentaron el número de brote significativamente más altos (19,1; 15 y 19,92, respectivamente). No se determinaron diferencias significativas entre estos tratamientos. Hassanein y Dorion (2005) informaron el número de brotes más alto de los segmentos de hojas de *P. capitatum* y *P. graveolens* cultivadas en un medio de $\frac{1}{2}$ MS que contenía 0,5 mg.L⁻¹ NAA + 1 mg.L⁻¹ BAP y zeatin. Zhou *et al.* (2007) señalaron que los segmentos de hojas y explantes de pecíolos producían el alto número de brotes en un medio de cultivo enriquecido con 1 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ NAA. Sin embargo, debido a nuestros resultados, parece que las hojas intactas dieron más número medio de brotes en la proliferación de *P. odoratissimum*. Según las conclusiones de Zuraida *et al.* (2013), utilizando 3 - 5 mg.L⁻¹ BAP redujo la proliferación de brotes en especies de *Pelargonium*. Se puede inferir que, para la proliferación adecuada, es necesaria una concentración definida

proliferation and shoot organogenesis. Moreover, high organogenesis potential in *Pelargonium* species has been reported by using different explants like leaf and petioles (Dunbar and Stephens, 1989; Yi Qy *et al.*, 2010).

In our experiment, leaf segments with 1.5 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ NAA, petioles with 2 mg.L⁻¹ BAP + 0.1 mg.L⁻¹ NAA and intact leaves with 1 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ NAA achieved the lowest rate of browning, the highest callus production with the subsequent greatest shoot number and tallest shoots.

Rooting and acclimatization

ANOVA (table 2) results revealed that the rooting related characteristics such as rooting percentage and mean number and length of roots were affected by NAA concentration (p<0.01). Furthermore, mean number and length of roots were significantly (p<0.01) affected by explant type. Just

de citoquinas. Según la cuadro 1, pecíolo desarrollado los brotes más cortos en todas las combinaciones de PGR excepto 2 mg.L⁻¹ BAP + 0,1 mg.L⁻¹ NAA, brotes de segmentos de hoja con 1,5; 2 y 4,5 mg.L⁻¹ BAP + 0,1 y 1 mg.L⁻¹ NAA y muestras de hojas intactas en todas las combinaciones de tratamiento excepto 2 mg.L⁻¹ BAP + 0,1 mg.L⁻¹ NAA, tuvo los brotes más altos, sin diferencias significativas entre ellos. En consecuencia, los brotes más largos en secciones de hojas y pecíolos de *P. odoratissimum* pertenecían al medio de cultivo que contenía 1 mg.L⁻¹ NAA + 5 mg.L⁻¹ BAP (Ghanem *et al.*, 2008).

Brown y Charlwood (1986) demostraron que la inducción y posterior elongación de brotes adventicios dependían de los diferentes factores como el tipo y la concentración de PGR, especialmente auxinas y citoquinas. Por lo tanto,

Table 2. ANOVA for the effects of NAA on roots characteristics of *Pelargonium odoratissimum* explants.

Cuadro 2. ANOVA para los efectos de NAA en las características de raíces de explantes de *Pelargonium odoratissimum*.

Source of variation	DF	Rooting (%)	Mean Squares	
			Mean root number	Mean root length
NAA	1	267.27**	248.88**	9.36**
Explant types	2	1.16 ^{ns}	39.04**	1.72**
NAA × Explant types	2	41.31 ^{ns}	6.25 ^{ns}	0.83*
error		81.32	3.21	0.27
CV		12.56	32.37	21.86

** Significant at p<0.01, * significant at p<0.05 and ns: non-significant. NAA = 1-naphthaleneacetic acid.

** Significativo en p<0,01; * significativo en p< 0,05 y ns: no significativo. NAA = Acido 1-naftalenacético.

root length was influenced ($p < 0.05$) by the interactions of treatment and explant type.

Figure 1 shows that rooting percentage of the shoots derived from leaf segments, petioles and intact leaves was about 58 % and 98 % at 0.1 and 0.2 mg.L⁻¹ NAA, respectively. NAA concentration suitable for rooting for all three explants was 0.2 mg.L⁻¹ Boase *et al.* (1998), Zhou *et al.* (2007) and Zuraida *et al.* (2013) reported the same NAA concentration for the best rooting percentage and root number in *Pelargonium* species as well. Brown and Charlwood (1986) as well as Ghanem *et al.* (2008) also reported that for *P. graveolens*. For root number, 0.2 mg.L⁻¹ NAA was the best concentration. Among the explants, intact leaves had the highest mean root number (table 3).

la alta proporción de citoquina a auxina es el factor que afecta a la proliferación y la longitud del brote en especies de *Pelargonium* (Brown y Charlwood, 1986; Dunbar y Stephens, 1989). Las altas de citoquina y bajas tasas de auxina indujeron un aumento de la formación y elongación del brote. Las tasas endógenas de auxina seguramente afectan el fenómeno. Algunos autores al observado que altas tasas de citoquinas mejora la proliferación y organogénesis del brotes. Además, se ha notificado un alto potencial de organogénesis en especies de *Pelargonium* mediante el uso de diferentes explantes como hojas y pecíolos (Dunbar y Stephens, 1989; Yi Qy *et al.*, 2010). En nuestro experimento, segmentos de hoja con 1,5 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ NAA, pecíolos con 2 mg.L⁻¹ BAP +

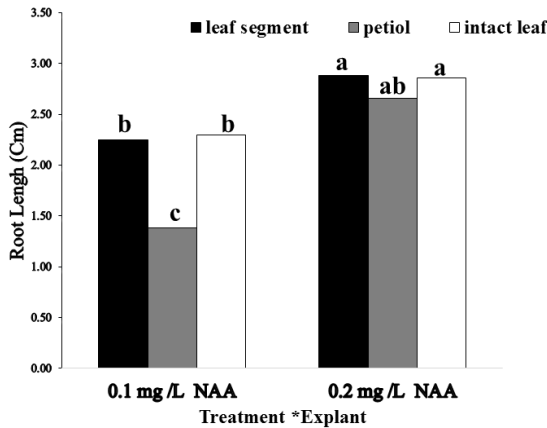


Figure 1. Effect of NAA concentration on the percentage of rooting of *Pelargonium odoratissimum* *in vitro*. NAA = 1-naphthaleneacetic acid.

Figura 1. Efecto de concentración de NAA en el porcentaje de enraizamiento de *Pelargonium odoratissimum* *in vitro*. NAA = 1-ácido naftalenacético.

Table 3. NAA concentration and explant type effects on root number of *Pelargonium odoratissimum* in vitro.**Cuadro 3. Efectos de concentración de NAA y tipo de explante en el número de raíces de *Pelargonium odoratissimum* in vitro.**

NAA concentrations and explant types	Root number
0.1 mg.L ⁻¹ NAA	3.50 ^b
0.2 mg.L ⁻¹ NAA	7.57 ^a
Leaf segments	4.82 ^b
Petiole	4.64 ^b
Intact leaf	7.15 ^a

Different letters show statistically significant differences based on LSD test at $p < 0.05$.

Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas basadas en la prueba de LSD en $p < 0,05$.

As an accepted rule in tissue culture studies, auxin alone or in combination with small ratios of cytokinins are necessary for the root primordial initiation (Zuraida *et al.*, 2013). Internal hormonal balance is another major factor that affects the rooting potential of different explants. Figure 2 also clearly shows that for all explant types, again 0.2 mg.L⁻¹ NAA was the best concentration for the length of roots. Boase *et al.* (1998) reported that increasing NAA concentration up to 0.2 mg.L⁻¹ improved root formation in *P. odoratissimum*. Several former studies claim that rooting potential in *Pelargonium* species is related to the shoots quality.

Zuraida *et al.* (2013) showed that the highest rooting percentage and number was obtained in a medium enriched with 0.2 mg.L⁻¹ IBA + IAA. Similarly, Zhou *et al.* (2007) reported the same concentration of NAA for the rooting of *Pelargonium* plants. As all physiological processes, rooting potential and its subsequent growth

0,1 mg.L⁻¹ NAA y hojas completas con 1 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ NAA presentaron la tasa más baja de pardeamiento, la mayor producción de callos con el mayor número de brotes subsiguiente y los brotes más altos.

Enraizamiento y aclimatación

Los resultados de ANOVA (Cuadro 2) revelaron que las características relacionadas con el enraizamiento, como el porcentaje de enraizamiento y el número medio y la longitud de las raíces se vieron afectadas por la concentración de NAA ($p < 0,01$). Además, el número y la longitud de las raíces se vieron significativamente ($p < 0,01$) afectados por el tipo de explante. La longitud de la raíz fue influenciada ($p < 0,05$) por las interacciones del tratamiento y el tipo de explante.

La figura (1) muestra que el porcentaje de enraizamiento de los brotes derivados de segmentos foliares, pecíolos y hojas completas fue de aproximadamente el 58 % y el 98 % en 0,1 y 0,2 mg.L⁻¹ NAA, respectivamente. La concentración de

and development are dependent on hormonal balance inside the plant tissue. It seems that in some plant organs, the low amount of internal auxins necessitates the use of compensating concentration of exogenous auxins.

NAA adecuada para el enraizamiento de los tres explantes fue de 0,2 mg.L⁻¹. Boase *et al.* (1998), Zhou *et al.* (2007) y Zuraida *et al.* (2013) informaron también la misma concentración de NAA para el mejor porcentaje de enraizamiento y el número de raíces

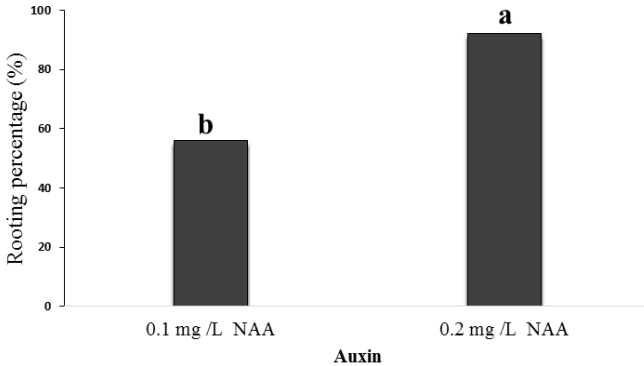


Figure 2. NAA concentration effect on root length of *Pelargonium odoratissimum in vitro*. NAA = 1-naphthaleneacetic acid.

Figura 2. Efecto de concentración de NAA sobre la longitud de la raíz de *Pelargonium odoratissimum in vitro*. NAA = 1-ácido naftalenacético.

Generally, root number and length affect the nutrients and water uptake and hence, hugely influence the plantlets establishment and growth. Finally, healthy rooted plantlets were selected to transfer to the pots containing peat-moss: perlite (1:1) in growth chambers under 16:8 hour photoperiod under 23 ± 1 °C and 20 ± 1 °C regime. One month later, the number of survived plants were recorded. Acclimatization was completely successful with 90 % of transferred plants were adapted to the greenhouse conditions.

en las especies de *Pelargonium*. Brown y Charwood (1986) así como Ghanem *et al.* (2008) también informaron que en *P. graveolens*. para el número de raíz, 0,2 mg.L⁻¹ NAA fue la mejor concentración. Entre los explantes, las hojas completas tenían el número medio más alto de raíces (cuadro 3).

Como regla aceptada en los estudios de cultivo de tejidos, la auxina sola o en combinación con pequeñas proporciones de citoquinas son necesarias para la iniciación primordial de la raíz (Zuraida *et*

Conclusion

This study was conducted to establish an efficient micropropagation protocol for *P. odoratissimum*. The overall results showed that *in vitro* derived intact leaf explants were superior to the other two explants (petiole and leaf segments), when considering their higher callus, shoot and root organogenesis and proliferation potential. Nonetheless, the BAP-NAA combination rates determined to a large extent the organogenesis potential. The highest callogenesis and shoot organogenesis were recorded for intact leaves on MS medium supplemented with 1 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ NAA, with similar results for leaf segments when grown on 1.5 and 1 mg.L⁻¹ BAP and NAA, respectively, whereas petioles required 2 mg.L⁻¹ BAP and 0.1 mg.L⁻¹ NAA to bring out similar organogenesis. Acclimatization was 90 % successful under greenhouse conditions.

End of English Version

al., 2013). El equilibrio hormonal interno es otro factor importante que afecta el potencial de enraizamiento de diferentes explantes. La figura 2 también muestra claramente que para todos los tipos de explantes, de nuevo 0,2 mg.L⁻¹ NAA fue la mejor concentración para la longitud de las raíces. Boase *et al.* (1998) informaron que el aumento de la concentración de NAA hasta 0,2 mg.L⁻¹ mejoró la formación de raíces en *P. odoratissimum*. Varios estudios anteriores afirman que el potencial

de enraizamiento en especies de *Pelargonium* está relacionado con la calidad de los brotes.

Zuraida *et al.* (2013) mostraron que el mayor porcentaje y número de enraizamiento se obtuvo en un medio de cultivo enriquecido con 0,2 mg.L⁻¹ IBA + IAA. Del mismo modo, Zhou *et al.* (2007) informaron de la misma concentración de NAA para el enraizamiento de plantas de *Pelargonium*. Como todos los procesos fisiológicos, potencial de enraizamiento y su posterior crecimiento y desarrollo dependen del equilibrio hormonal dentro del tejido vegetal. Parece que, en algunos órganos vegetales, la baja cantidad de auxinas internas requiere el uso de la concentración compensadora de auxinas exógenas.

Generalmente, el número de raíces y la longitud afectan los nutrientes y la absorción de agua y, por lo tanto, influyen enormemente en el establecimiento y crecimiento de las plántulas. Finalmente, se seleccionaron plántulas de raíces sanas para trasplantar a las materas que contienen sustrato de turba-musgo: perlita (1:1) en cámaras de crecimiento inferiores a 16:8 horas de fotoperiodo bajo 23 ± régimen de 1°C y 20 ± 1°C. Un mes más tarde, se registró el número de plantas desarrolladas exitosamente. El acondicionamiento presentó valores altamente significativos, el 90 % de las plantas transferidas se adaptaron a las condiciones de invernadero.

Conclusión

Este estudio se llevó a cabo para establecer un protocolo de

micropropagación eficiente para *P. odoratissimum*. Los resultados generales mostraron que los explantes de hojas completas derivados *in vitro* eran superiores a los otros dos explantes (peciolo y segmentos foliares), al considerar su mayor potencial en el desarrollo de la callosidad, brote, organogénesis de raíz y proliferación. No obstante, las tasas de combinación BAP-NAA determinaron en gran medida el potencial de organogénesis. Los datos de mayor resultado en desarrollo de callogénesis y organogénesis de brotes se registraron para las hojas completas en el medio de cultivo MS suplementado con 1 mg.L⁻¹ BAP + 1 mg.L⁻¹ NAA, con resultados similares para segmentos de foliares cuando se cultiva en 1.5 y 1 mg.L⁻¹ BAP y NAA, respectivamente, mientras que los peciolo requirió 2 mg.L⁻¹ BAP y 0.1 mg.L⁻¹ NAA para sacar a la salida organogénesis similar. El acondicionamiento tuvo éxito en un 90 % en condiciones de invernadero.

(Geranium) an important medicinal and aromatic plant. *J. Med. Plant Res.* 7 (38): 2815-2822.

Bhuse, V.H., B.L. Lad, D.K. Patil, and V.M. Karade. 2003. Effect of time of planting, type of cutting and plant growth regulators on rooting in *Pelargonium graveolens* L. Herit. *Indian J. Agric. Res.* 3:29-33

Boase, M.R., J.M. Bradley and N.K. Borst. 1998. An improved method for transformation of regal pelargonium (*Pelargonium x domesticum* Dubonnet) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant. Sci.* 139:59-69.

Brown, J.T. and B.V. Charlwood. 1986. The accumulation of essential oils by tissue cultures of *Pelargonium fragrans* (Willd). *Fed. Europ. Biochem. Soc.* 204 (1): 117- 120.

Desilets, H., Y. Desjardins and R. Belanger. 1993. Clonal propagation of *Pelargonium x hortorum* through tissue culture: Effects of salt dilution and growth regulator concentration. *Can. J. Plant. Sci.* 73: 871-878.

Dunbar, K.B. and C.T. Stephens. 1989. Shoot regeneration of hybrid seed geranium (*Pelargonium x hortorum*) and regal geranium (*Pelargonium x domesticum*) from primary callus cultures. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 19: 13-21.

Ghanem, S. A., U.I. Aly, A.A. El-kazzaz, A. Abdel-Samad and N.M. Arafa. 2008. *In vitro* regeneration of *Pelargonium graveolens*. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 6 (2): 15-18.

Gharib, F.A.L. 2005. Changes in regeneration and oil accumulation of *Pelargonium nervosum* under various culture condition. *J. Bio. Sci.* 5(5): 670-677.

Gupta, R., S.K. Gupta, S. Banerjee, G.R. Mallavarapu and S. Kumar. 2002. Micropropagation of Elit cultivars of rose-scented Geranium (*Pelargonium graveolens* L' Herit.) for industrial production of propagules. *Indian. J. Biotechnol.* 1: 286-291.

Hassanein, A. and N. Dorion. 2005. Efficient plant regeneration system from

Cited literature

Agarwal, R.K. and A.S. Ranu. 2000. Regeneration of plantlets from leaf and petiole explants of *Pelargonium hortorum*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 36:392-397.

Arshad, M., J. Silvestre, G. Merlina, C. Dumat, E. Pinelli and J. Kellerhoff. 2012. Thidiazuron-induced shoot organogenesis from mature leaf explants of scented *Pelargonium capitatum* cultivars. *Plant. Cell. Tiss. Org. Cult.* 108: 315-322.

Benazir, J.F., R. Suganthi, P. Chandrika and B. Mathithumilan. 2013. *In vitro* regeneration and transformation studies on *Pelargonium graveolens*


- leaf discs of zonal (*Pelargonium x Hortorum*) and two scented (*P. capitatum* and *P. graveolens*) geraniums. Plant. Cell. Tiss. Org. Cult. 83: 231-240.
- Linsmaier, E.M., F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18: 100-127.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Rao, P.V.L. 1994. *In vitro* plant regeneration of scented-leaved geranium *Pelargonium graveolens*. Plant. Sci. 98:193-198.
- Saxena, G., S. Banerjee, L. Rahman, G.R. Mallavarapu, S. Sharma and S. Kumar. 2000. An efficient *in vitro* procedure for micropropagation and generation of somaclones of rose scented *Pelargonium*. Plant. Sci. 155: 133-140.
- Skoog, F. and C.O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118-131.
- SPSS software. 2012. SPSS user's guide, v. 21. IBM Corporation. New York, NY, USA.
- Sukhumpinij, P., F. Kakihara and M. Kato. 2010. *In vitro* regeneration from mature leaf explants of *Pelargonium rapaceum* (L.) L'Hérit. Sci. Hortic. 126: 385-389.
- Tembe, R.P. and M. Deodhar. 2010. Clonal propagation different cultivars of *Pelargonium graveolens* (L' Herit) viz Reunion, Bourbon and Egyptian. Biotechnol. 9 (4): 492-498.
- Wojtania, A., E. Gabryszewska and A. Marasek. 2004. Regeneration of *Pelargonium x hederacifolium* 'Bonete' from petiole explants. Acta. Physiol. Plant. 26 (3): 255-262.
- Yi QY, X., K.G. Jiang and M.H.T. Ren. 2010. Study on *in vitro* shoot culture of *Pelargonium graveolens* and its production. J. S. China. J. Agri. 2: 59-67.
- Zhou, J., G. Ma, E. Bunn and X. Zhang. 2007. *In vitro* shoot organogenesis from *Pelargonium Citrosium* Vanleenii leaf and petiole explants. Flori. Orna. Biotech. 1(2): 147-149.
- Zuraida, A.R., M.A. Shukri, O. Ayu Nazreena and Z. Zamri. 2013. Improved micropropagation of biopesticidal plant, *Pelargonium radula* via direct shoot regeneration. Am. J. Res. Commun. 1(1): 1-12.

Relación entre factores agronómicos y nivel del daño por ardillas rojas a mazorcas de cacao en la Cordillera de Mérida, Venezuela

Relationship between agronomic factors and level of damage by red squirrels to cocoa pods in the Cordillera de Mérida, Venezuela

Relação entre fatores agronômicos e magnitude de danos por esquilos vermelhos às cascas de cacau na Cordillera de Mérida, Venezuela

Misael Molina^{1*} y Jesús Briceño²

Universidad Nacional Experimental Sur del Lago, Venezuela. ¹Grupo de Investigaciones en Acuicultura y Zoología Aplicada. Correo electrónico: molinam@unesur.edu.ve, .

²Programa Ingeniería de La Producción Agropecuaria, Núcleo La Victoria, Venezuela. Correo electrónico: jesusb892@gmail.com.

Resumen

El cacao es un cultivo tropical de gran importancia económica y ecológica, con gran potencial en Venezuela, donde su productividad resulta afectada principalmente por enfermedades fungosas y ardillas. El objetivo del trabajo fue analizar la relación entre el nivel de daño y algunas variables agronómicas y ambientales en 39 unidades de producción del estado Mérida. Los tipos de cacao presentes se clasificaron como criollo, forastero e híbrido. Los porcentajes de daño fueron transformados a arcoseno y se agruparon en categorías subjetivas según las variables; la relación fue analizada estadísticamente utilizando pruebas no paramétricas: Kruskal-Wallis, Kolmogorov-Smirnov y Moses, asumiendo $\alpha = 0,05$. El nivel de daño no resultó estadísticamente diferente ($p > 0,05$) entre los cultivos ubicados a diferentes altitudes. Lo mismo ocurrió con las variables tamaño del lote, densidad de siembra, número de cultivares, nivel de agroquímicos, tipo de vegetación aledaña y distancia al bosque. El nivel de daño resultó estadísticamente diferente ($p < 0,05$) entre las unidades de producción que diferían en el número de cultivos asociados. El nivel de daño también resultó estadísticamente diferente en función de la cantidad de árboles de sombra.ha⁻¹ y entre aquellos que diferían

Recibido el 13-05-2020 • Aceptado el 26-08-2020.

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: molinam@unesur.edu.ve

con respecto a la presencia/ausencia de frutos alternativos. Se concluye que la complejidad estructural de los cultivos funciona como un elemento integrador en la determinación del nivel de daño causado por las ardillas y define la idoneidad de su hábitat.

Palabras clave: estructura, hábitat, *Notosciurus*, sombra, *Theobroma cacao*.

Abstract

Cocoa is a tropical crop of great economic and ecological importance, with great potential in Venezuela, where fungal diseases and squirrels, affect its productivity. The objective of the work was to analyze the relationship between the level of damage and some agronomic and environmental variables in 39 production of the state of Merida. The types of cocoa present were classified as criollo, forastero and hybrid. The damage percentages were transformed to arcsine and grouped into subjective categories according to the variables; the relationship was statistically analyzed using non-parametric tests: Kruskal-Wallis, Kolmogorov-Smirnov, and Moses, assuming $\alpha = 0.05$. The level of damage was not statistically different ($p > 0.05$) between the crops located at different altitudes. The same occurred with the variables cocoa lot size, planting density, number of cultivars, level of agrochemicals, type of vegetation surrounding the crop, and distance to the forest. But the level of damage was statistically different ($p < 0.05$) between the production units that differed in the number of associated crops. The level of damage was also statistically different according to the number of shade trees. ha^{-1} and among those that differed with respect to the presence/absence of alternative fruits. It is concluded that the structural complexity of the crops functions as an integrating element in determining the level of damage caused by squirrels and defines the suitability of their habitat.

Key words: structure, habitat, *Notosciurus*, shade, *Theobroma cacao*.

Resumo

O cacau é uma cultura tropical de grande importância econômica e ecológica, com grande potencial na Venezuela, onde sua produtividade é afetada principalmente por doenças fúngicas e esquilos. O objetivo do trabalho foi analisar a relação entre o nível de dano e algumas variáveis agrônomicas e ambientais em 39 unidades produtivas do estado de Mérida. Os tipos de cacau presentes foram classificados em crioulos, estrangeiros e híbridos. As porcentagens de dano foram transformadas em arco seno e agrupadas em categorias subjetivas de acordo com as variáveis; a relação foi analisada estatisticamente por meio de testes não paramétricos: Kruskal-Wallis, Kolmogorov-Smirnov e Moses, assumindo $\alpha = 0,05$. O nível de dano não foi estatisticamente diferente ($p > 0,05$) entre as culturas localizadas em altitudes diferentes. O mesmo aconteceu com as variáveis tamanho do lote, densidade de plantio, número de cultivares, nível

de agroquímicos, tipo de vegetação circundante e distância até a floresta. O nível de dano foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) entre as unidades de produção que diferiram no número de safras associadas. O nível de dano também foi estatisticamente diferente em função do número de árvores de sombra.ha⁻¹ e entre aquelas que diferiram quanto à presença/ausência de frutos alternativos. Conclui-se que a complexidade estrutural das culturas funciona como elemento integrador na determinação do nível de danos causados pelos esquilos e define a adequação do seu habitat.

Palavras chave: estrutura, habitat, *Notosciurus*, sombra, *Theobroma cacao*.

Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol de origen amazónico (Bartley, 2005) de la familia Malvaceae que se cultiva en áreas tropicales de casi todo el mundo, especialmente en África y América (López *et al.*, 2014). Cuenta entre los cultivos de mayor importancia para la alimentación humana y es una opción productiva real para el campo (Boaitey, 2016). También es valioso para reforestar, enriquecer el suelo, y como refugio para la vida silvestre (Guaricocha *et al.*, 2001; Vereá and Solórzano, 2005).

El cacao tiene gran importancia económica. La producción mundial en grano para el periodo 2016-2017 superó las 4.000.000 t y se cotizó en 2746,23 US \$.t⁻¹ (ICCO, 2018), siendo Costa de Marfil el principal productor con más de 2.000.000 t; pero en la lista de los primeros diez países productores también figuran naciones de centro y Suramérica: Ecuador se ubica en la posición 3 con 280.000 t, Brasil en la casilla 7 con 204.000 t, Perú está de octavo con 139.000 t y República Dominicana se ubica en el puesto 10 con 70.000 t (ICCO, 2020).

Introducción

The cocoa (*Theobroma cacao* L.) is a tree of Amazonian origin (Bartley, 2005) of the Malvaceae family which is cultivated in tropical areas of almost all the world, especially in Africa and America (López *et al.*, 2014). It is one of the most important crops for human consumption and is a true productive option for the field (Boaitey, 2016). It is also beneficial for reforestation, enriching the soil, and as a refuge for wildlife (Guaricocha *et al.*, 2001; Vereá and Solórzano, 2005).

The cocoa is of great economic importance. World production for the 2016-2017 period exceeded 4.000.000 t and was priced at 2746, 23 US \$.t⁻¹ (ICCO, 2018), being the Ivory Coast the first producer with more than 2.000.000 t; but the list of the top ten producing countries also includes nations from Central and South America: Ecuador is in position 3 with 280.000 t, Brazil is in box 7 with 204.000 t, Peru is eighth with 139.000 t and the Dominican Republic is located in 10th place with 70.000 t (ICCO, 2020).

Venezuela producía unas 20.000 t de para el período 2017-2018 (ICCO, 2018) y según la lista publicada en el World Population Review (2020), nuestro país produce hoy en día más de 23.000 t, ubicándose en la posición 14. El precio actual del cacao es de 2061,61 US \$ (ICCO, 2020), una disminución aproximada de 25 % con respecto al período 2016-2017; sin embargo, y asumiendo que la producción en el país se mantiene con respecto a los niveles de 2017-2018, nuestra nación debería generar actualmente más de 40 millones de US \$.año⁻¹ (para julio de 2020 - aprox. 43 \$.barril Brent⁻¹) que equivalen aproximadamente a un millón de barriles de petróleo.

Por lo mencionado anteriormente y como consecuencia del aparente direccionamiento del país hacia la reducción de la dependencia de la renta petrolera en los últimos años, es necesario retomar seriamente la producción de cacao como fuente de divisas.

Las mayores pérdidas económicas que sufren los productores de cacao en Venezuela son causadas por enfermedades fungosas, principalmente la moniliasis por *Moniliophthora roreri*, la pudrición negra del fruto por *Phytophthora palmivora*, y el cáncer de tronco y ramas por *Botryodiplodia theobromae* (Parra y Camejo, 2015). Adicionalmente, la ardilla roja común (*Notosciurus granatensis* Humboldt) es señalada como una plaga (Linares, 1988).

Sciuridae es la segunda familia de ardillas más diversa y las especies allí incluidas cumplen un importante

Venezuela produced about 20.000 t of cocoa beans for the period 2017-2018 (ICCO, 2018) and according to the list published in the World Population Review (2020), our country today produces more than 23.000 t, ranking 14th. The current price of cocoa is 2061,61 US \$ (ICCO, 2020), which implies an approximate decrease of 25% with regard to the value reached in the period 2016-1017; however, and assuming that the current production in the country as compared to the levels of 2017-2018 is maintained, at the current price, our nation should generate more than 40 million US \$. year⁻¹ (for July 2020 -approx.43 \$. Brent barrel⁻¹) which is equivalent to approximately one million barrels of oil.

Due to the aforementioned and because of the apparent orientation of the country towards reducing dependence on oil income in recent years, it is necessary to return seriously to cocoa production as a source of foreign exchange.

The greatest economic losses suffered by cocoa producers in Venezuela are due to fungal diseases, mainly the moniliasis by *Moniliophthora roreri*, the black rot of the fruit by *Phytophthora palmivora*, and the trunk and branch cancer caused by *Botryodiplodia theobromae* (Parra and Camejo, 2015). Additionally, the common red squirrel (*Notosciurus granatensis* Humboldt 1811) is reported as a pest (Linares, 1988).

Sciuridae is the second most diverse family of squirrels and the species included there play an

rol ecológico, como dispersoras y depredadoras de semillas y esporas (Mendes *et al.*, 2019). El daño por ardillas de la familia Sciuridae es común en todas las latitudes donde hay cacao y puede tener un impacto económico importante (Wood y Singleton, 2014). En Ghana y Sierra Leona se reportan daños por *Notosciurus gambianus* y *Fanisciurus* sp. (Lee, 1982); en Guinea Ecuatorial por *Paraxerus poensis*, *Potoxerus stangeri*, *Myosciurus pumilio*, *Heliosciurus rufobrachium* y *Funisciurus leucogenis* (Smith y Nott, 1988); en India por *Funambulus tristriatus* y *F. palmarum* (Bhat *et al.*, 1981); en América del Norte y Centroamérica por *Sciurus variegatoides* (Monge e Hilje, 2006); en Trinidad y Tobago, (Emmandie y Warren, 1993; Mollineau *et al.*, 2008), al igual que en Venezuela, Linares (1998), Mollineau *et al.*, (2008) y Molina y Briceño (2018) atribuyen el ataque a la ardilla roja común (*N. granatensis*).

Aunque Linares (1998) señala que las ardillas se alimentan de las mazorcas de cacao en Venezuela, el daño causado por estos roedores en el país, exceptuando un estudio publicado recientemente por Molina y Briceño (2018), no está suficientemente documentado. Sin embargo, para otros países de la América tropical se reportan daños muy significativos; por ejemplo, López *et al.*, (2014) señalan pérdidas entre 26 y 34 % en Nicaragua y Mollineau *et al.*, (2008) reportaron pérdidas superiores al 30 % en Trinidad y Tobago.

important ecological role: on the one hand as seed and spore dispersers and on the other as seed predators (Mendes *et al.*, 2019). Damage from squirrels of the Sciuridae family is common in all latitudes where cocoa is found and could have a significant economic impact (Wood and Singleton, 2014). In Ghana and Sierra Leona damage by *Sciurus gambianus* and *Fanisciurus* sp. (Lee, 1982) is reported; in Equatorial Guinea by *Paraxerus poensis*, *Potoxerus stangeri*, *Myosciurus pumilio*, *Heliosciurus rufobrachium* and *Funisciurus leucogenis* (Smith and Nott, 1988); in India by *Funambulus tristriatus* and *F. palmarum* (Bhat *et al.*, 1981); in North and Central America by *Sciurus variegatoides* (Monge and Hilje, 2006); in Trinidad and Tobago Emamdie and Warren (1993), Chadee and Chadee (1994) and Mollineau *et al.*, (2014), as well as in Venezuela Linares (1998), Mollineau *et al.*, (2008) and Molina and Briceño (2018) attribute the attack to the common red squirrel (*N. granatensis*).

Although Linares (1998) point out that squirrels feed of cocoa pods in Venezuela, the damage caused by these rodents in the country, except for a study recently published by Molina and Briceño (2018), does not is sufficiently detailed. However, for other countries in tropical America, very significant damages are reported; for example, López *et al.*, (2014) indicate losses between 26 and 34 % in Nicaragua and Mollineau *et al.*, (2008) reported losses greater than 30 % in Trinidad and Tobago.

El problema radica en que la distribución geográfica de las ardillas es similar a la del cacao (Emmandie y Warren, 1993). Las ardillas muerden las mazorcas para extraer las semillas y alimentarse del mucilago que las recubre; algunas mazorcas son devoradas totalmente. Las semillas pueden fermentarse y sufrir cambios en su sabor y aroma (Coulibaly, 1982) y quedan expuestas a hongos y bacterias (Parra y Camejo, 2015) que las dañan por completo. Como consecuencia, se reduce la productividad de los cultivos y por ende los ingresos de los productores (López *et al.*, 2014; Mollineau *et al.*, 2008).

El objetivo del presente trabajo fue analizar la relación entre el nivel de daño por ardillas rojas (*S. granatensis*) y algunos factores agronómicos y ambientales en cultivos del occidente de la Cordillera de Mérida.

Materiales y métodos

Las 39 unidades de producción (UP) en las que se desarrolló el trabajo están distribuidas como se indica en la Figura 1 y en el Cuadro 1.

El área de estudio es montañosa, con colinas, conos y valles. Las colinas de arcillas y areniscas son pequeñas, con pendientes entre 10° y 30° modeladas por la erosión cuaternaria sobre las formaciones terciarias y algunas acumulaciones del pleistoceno inferior. Los conos contienen también cuarcitas, granitos, gneis y esquistos. Los valles cubren aproximadamente 10 % del piedemonte, están constituido por depósitos sedimentarios de los ríos y tienen pendientes entre 3 y 5 % sobre los conos o formaciones terciarias (La Marca, 1997).

The problem is rooted on the fact that the geographic distribution of squirrels is similar to that of cocoa (Emmandie and Warren, 1993). Squirrels bite the pods to extract the seeds and feed on the mucilage that covers them; some pods are eaten, others are partially eaten. The seeds can ferment changing their flavor and smell (Coulibaly, 1982) and stay exposed to fungi and bacteria (Parra and Camejo, 2015; Quesnel and López, 1975) that damage them completely. Consequently, the productivity of the crops, and therefore the producer's income of the decreases (López *et al.*, 2014; Mollineau *et al.*, 2008).

The objective of this work was to analyze the relationship among the level of damage caused by red squirrels (*N. granatensis*) and some agronomic and environmental factors in cocoa crops of the western Cordillera de Mérida.

Materials and methods

The 39 production units (PU) in which the work was developed are distributed as indicated in Figure 1 and in Table 1.

The study area is mountainous, with hills, cones, and valleys. The hills of clays and sandstones are small, with slopes between 10° and 30° shaped by Quaternary erosion on the Tertiary formations and some accumulations of the Lower Pleistocene. The cones are composed of sandstones, quartzites, granites, gneiss, and schists. The valley sub landscape covers approximately 10 % of the foothills and is constituted

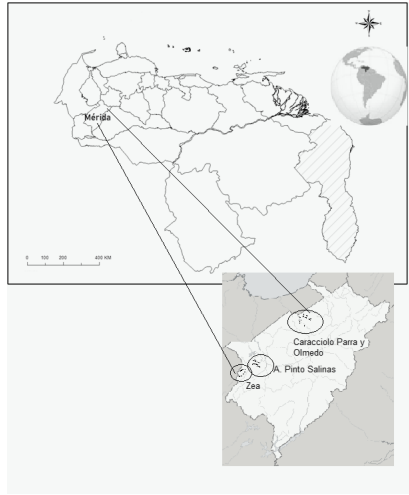


Figura 1. Ubicación relativa de las unidades de producción en el área de estudios.

Figure 1. Relative location of the production units in the study area.

El clima es variable y está determinado principalmente por el relieve y la altitud que condicionan a su vez la magnitud de la temperatura y las precipitaciones. La altitud causa una disminución entre 0,60 a 0,65 °C por cada 100 m. Los meses más calurosos son mayo y junio. La precipitación media anual para Mesa Bolívar, población característica de este piso térmico subtropical ubicada a 1170 msnm es de 1150 mm.

Según Huber y Alarcón (1988), la vegetación original del área de estudio corresponde a bosques ombrófilos basimontanos semidecuidos estacionales, con árboles remanentes de hasta 35 m de altura, con dos estratos arbóreos y densidad variable, hasta los 800 msnm, y bosques ombrófilos submontanos siempreverdes, entre los 800 y 1800-2000 msnm.

of sedimentary deposits from the rivers and has slopes between 3 and 5% on the cones or tertiary formations (La Marca, 1997).

The climate is variable and is mainly regulated by the relief and altitude, which in turn determine the magnitude of temperature and rainfall. The altitude causes a decline in temperature between 0.60 to 0.65 °C for each 100 m of altitude. The hottest months are May and June. The mean annual rainfall for Mesa Bolívar, a characteristic town of this subtropical thermal floor located at 1170 m.a.s.l., is 1150 mm.

According to Huber and Alarcón (1988), the native vegetation of the study area corresponds to seasonal semi-deciduous basimontan ombrophilous forests, with trees

Cuadro 1. Localización y altitud de las unidades de producción muestreadas para el estudio de la relación entre factores agronómicos y nivel del daño por ardillas rojas a mazorcas de cacao en la Cordillera de Mérida, Venezuela.

Table 1. Location and altitude of the production units sampled to study the relationship among agronomic factors and the level of damage by red squirrels to cocoa pods in the Cordillera de Mérida.

Nombre de la UP	Municipio, localidad y altitud (msnm)	Nombre de la UP	Municipio, localidad y altitud (msnm)
	Antonio Pinto Salinas, Mesa Bolívar		Zea, Zea
Santa Lucía I	750		
Santa Lucía II	750		
San Rafael,	800	La Hedionda	770
Mi Refugio	820	La Loma	775
El Porvenir	850	El Milagro	765
La Vega	850	San Isidro	1026
La Escondida	720	Los Labradores	1034
El Silencio	720	El Vegón	1005
Los Manzanos	780	Apure	875
Santísima Trinidad I	362	La Vega	810
Santísima Trinidad II	622	La Plata	611
La Florida	657		
La Trinidad	853		
	Caracciolo Parra y Olmedo	Caracciolo Parra y Olmedo, Río Frío	
	Mesa Julia		
La Esperanza	194		
Las Tres Palmas	194	San Rafael	388
Canaima	221	La Planada	181
San Isidro	290	Los Cedros	196
La Cañada	262	La Esperanza I	216
Los Caraños	309	La Esperanza II	329
La Fontana	365	El Rosal	345
La Candelaria	389	Los Taguanes	464
Mi Herencia	391	La Montaña	538

msnm: metros sobre el nivel del mar.

msnm: meters above sea level.

Los suelos son arcillosos, débilmente ácidos, bastante meteorizados y tienen buen drenaje. Todos son aluviones recientes y por eso son fértiles (Vivas, 1992).

up to 35 m high, with two arboreal strata and variable density, up to 800 m.a.s.l., and evergreen submontane ombrophilous forests, between 800 and 1800-2000 m.a.s.l.

El levantamiento de la información resumida en el Cuadro 2 fue desarrollado entre octubre de 2017 y marzo de 2018. En cada UP se seleccionaron 12 plantas al azar, indistintamente de si contenían o no árboles frutales. Para aleatorizar la selección, cada UP se dividió en cuatro sectores; con la ayuda de una tabla de números aleatorios se escogió uno de esos sectores y se delimitó con cinta plástica de color un área de un $\frac{1}{4}$ ha del centro del sector y se numeraron todas las plantas de cacao presentes; luego se escogieron las 12 plantas utilizando la tabla; en cada planta se contó el número de mazorcas y se verificó la cantidad de mazorcas mordidas por las ardillas.

Según Molina y Briceño (2018), las mazorcas de cacao son dañadas por ardillas y pájaros carpinteros de varias especies, pero no se han encontrado evidencias de ataque por otras especies de mamíferos. Según estos autores, el daño por ardillas se distingue fácilmente del causado por pájaros carpinteros pues éstos perforan las mazorcas dejando orificios circulares de diámetro no mayor de 2 cm, mientras que las ardillas hacen cavidades de forma irregular que pueden abarcar casi todo el fruto; además; en las mazorcas mordidas por las ardillas se pueden apreciar los surcos que dejan los dientes incisivos con los que las roen (Figura 2).

Los tipos de cacao se clasificaron como criollo, forastero e híbrido. La ubicación de las UP (altitud y coordenadas geográficas) fue definida con un GPS Garmin E-trex₂₀.

The soils are clayey, weakly acidic, quite weathered, and well-drained. All are recent alluviums and therefore are fertile (Vivas, 1992).

The information summarized in Table 2 was collected between October 2017 and March 2018. In each PU, 12 plants were randomly selected, regardless of whether or not they contained fruit trees. To randomize the selection, each PU was divided into four sectors; with the help of a table of random numbers, one of these sectors was chosen and an area of $\frac{1}{4}$ ha from the center of the sector was delimited with colored plastic tape and all the cocoa plants present were numbered; then the 12 plants were chosen using the table; in each plant, the number of pods was counted and the number of pods bitten by the squirrels was verified.

According to Molina and Briceño (2018), cocoa pods are damaged by red squirrels and various species of woodpeckers, but they found no evidence of attack by other species of mammals. These authors indicate that damage by squirrels is easily distinguished from that caused by woodpeckers because they pierce the pods leaving circular cavities whose diameter usually does not exceed 2 cm, while squirrels leave much larger and irregularly shaped apertures that can cover almost all the fruit; furthermore, on the pods bitten by the squirrels, the grooves left by the incisor teeth with which they gnaw on them can be seen (Figure 2).

The varieties of cocoa were classified as criollo, forastero and hybrid. The location of the PU

Cuadro 2. Variables incluidas en el análisis de la relación entre factores agronómicos y ambientales y el nivel de daño por ardillas a mazorcas de cacao.

Table 2. Variables included in the analysis of the relationship among the agronomic and environmental factors and the level of damage by red squirrels to cocoa pods.

Variable	Categorías	Prueba estadística usada
Altitud	I: hasta 500 msnm II: > 500 msnm	
Tamaño del lote	I: < 4 ha II: de 5 a 10 ha III: de 11 a 15 ha IV: > 15 ha	
Tipo de vegetación aledaña	I: Otras plantaciones de cacao II: Rastrojos III: Bosques secundarios IV: Pastizales	Kruskal-Wallis para muestras independientes $\alpha = 0,05$
Densidad de siembra	I: cuadros de 2m x 2m II: cuadros de 3m x 3m III: cuadros de 4m x 4m IV: > 4m x 4m	
Nivel de uso de agroquímicos	I: No usa agroquímicos II: Usa agroquímicos	
Distancia cultivo-bosque	I: De 1 a 100 m II: > 100 m	
Número de cultivares	I: 1 cultivar II: 2 o más cultivares	Kolmogorov-Smirnov para dos muestras independientes $\alpha = 0,05$
Número de cultivos asociados	I: De 0 a 2 II: > 2 cultivos asociados	
Número de árboles de sombra.ha ¹	I: De 0 a 20 II: > 20	
Presencia de frutos alternativos	I: Con frutales alternativos II: Sin frutales alternativos	Prueba de Moses $\alpha = 0,05$

El porcentaje de daño fue calculado como el cociente entre el número de mazorcas mordidas y el número de mazorcas total x 100. Para las pruebas estadísticas el porcentaje

(altitude and geographic coordinates) was defined using a GPS Garmin E-trex₂₀.

The percentage of damage was calculated as the quotient between the

de daño fue transformado a arcoseno (Ahrens *et al.*, 1990; Warton y Hui, 2011).

number of pods bitten and the number of total pods x 100. For statistical tests, the percentage of damage was



Figura 2. Detalles del daño causado por las mordidas de las ardillas rojas (*N. granatensis*) a una mazorca madura de cacao criollo.

Figure 2. Details of the damage caused by the red squirrel (*N. granatensis*) bites to a mature pod of criollo cocoa.

El resto de las variables fueron tipificadas para reducir las diferencias debidas a las distintas escalas (Sokal y Rolph, 1995), es decir, se calculó el promedio y la desviación estándar; el valor tipificado se calculó restando el valor original del promedio de la variable y el valor resultante fue dividido por la desviación estándar.

Los datos fueron procesados estadísticamente usando el programa SPSS versión 20 (IBM, 2011). Para

transformed to arcsine (Ahrens *et al.*, 1990; Warton and Hui, 2011).

The remaining variables were typified to reduce the differences due to the diverse scales in which they are expressed (Sokal and Rolph, 1995), that is, the average and standard deviation were calculated; the typified value was determined by subtracting the original value of the average of the variable and the resulting value was divided by the standard deviation.

estudiar la relación entre el nivel de daño y el resto de las variables, los datos se agruparon en categorías subjetivas (Cuadro 2) buscando uniformidad en el tamaño de los grupos y se procesaron estadísticamente siguiendo los criterios de Siegel y Castellán (2007).

Se consideran como frutos alternativos para las ardillas aquellos nativos o cultivados, que son consumidos de forma ocasional por estos roedores; los principales son: guama (*Inga* spp. Mill), aguacate (*Persea americana* Mill), jobo (*Spondias mombin* L.) y pomarrosa (*Syzygium jambos* L.).

Resultados y discusión

El nivel de daño varió entre cero y 44 %, siendo (en promedio) 12 % para las UP ubicadas en Mesa Bolívar, 10 % para las de Zea, 13 % para las de Mesa Julia y 3 % para las de Río Frío. Estos resultados contrastan con los de López *et al.* (2014) quienes encontraron pérdidas entre 26 y 34 % para Nicaragua y con los de Mollineau *et al.* (2008) quienes reportaron pérdidas superiores al 30 % para Trinidad y Tobago. Si bien el nivel de daño encontrado es inferior al reportado por estos autores, no es de poca importancia para los productores merideños, pues ellos están enfrentando una grave crisis. Al nivel de campo esto se expresa principalmente a través de la escases y los costos elevados de los agroinsumos y la mano de obra. Además, las pérdidas causadas por ardillas deben sumarse a las generadas por hongos,

The data were statistically processed using the SPSS IBM® version 20 program (IBM, 2011). To study the relationship among the level of damage and the rest of the variables, these were grouped into subjective categories (Table 1) to homogenize the group size, and statistically processed following the Siegel and Castellán's (2007) criteria.

The alternative fruits for squirrels are those native or cultivated, other than cocoa, which are occasionally consumed by these rodents; the main ones are: guama (*Inga* spp. Mill), avocado (*Persea americana* Mill), jobo (*Spondias mombin* Mill), and pomarosa (*Syzygium jambos* L.).

Results y discussion

The level of damage varied between zero and 44 %, being (on average) 12 % for the PU's located in Mesa Bolívar, 10 % for those located in Zea, 13 % for those belonging to Mesa Julia, and 3 % for the PU's in Río Frio. These results contrast with those of López *et al.*, (2014) who found losses between 26 and 34% for Siuna, Nicaragua, and with those of Mollineau *et al.*, (2008) who reported losses greater than 30% for Trinidad and Tobago. Although the level of damage found is lower than that reported by these authors, it is not of little importance for Mérida producers, since they are facing a severe crisis. At the field level, this is expressed mainly through the scarcity and high costs of agro-inputs and labor. Also, the losses caused by squirrels must be added to those generated by fungi,

cuya magnitud en algunas regiones del neotrópico es de aproximadamente 40 % (Correa *et al.*, 2014); de hecho, ambos problemas están relacionados ya que, en muchos casos, las mazorcas de cacao que no son dañadas por completo por las ardillas, son atacadas por hongos y bacterias que las inutilizan por completo (Molina y Briceño, 2018).

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) para el nivel de daño entre las categorías de altitud de las UP. Esto se debe probablemente a que las ardillas rojas tienen un amplio rango de distribución geográfica, tanto en sentido longitudinal como altitudinal (Linares, 1998), igual que ocurre con el cacao (López *et al.*, 2014); además se trata de roedores que, por ser estrategas r, están adaptados para explotar al máximo los recursos disponibles y así garantizar una progenie numerosa (Krebs, 1985). Este resultado contrasta con el de López *et al.*, (2014) quienes encontraron que el daño es mayor en cultivos ubicados entre 200 y 300 msnm.

No se encontraron diferencias ($p > 0,05$) en el nivel de daño entre las categorías de tamaño de los lotes de cacao. Ello puede deberse a que el tamaño de las UP tiende a ser pequeño y a que las ardillas tienen una alta movilidad (Zollner, 2000). En el Sector Mesa Bolívar-El Bordo, en Río Frío y en Zea, aproximadamente dos tercios tienen menos de 2 ha de superficie, mientras que en Santo Tomás y Mesa Julia, dos tercios de las UP tienen entre 3 y 5 ha.

No se encontraron diferencias ($p > 0,05$) en el nivel de daño entre las categorías de distancia al bosque. Sin

whose magnitude in some neotropical regions is approximately 40% (Correa *et al.*, 2014); in fact, both problems are related since, in many cases, the cocoa pods that are not completely damaged by squirrels are attacked by fungi and bacteria that render them completely useless (Molina and Briceño, 2018).

No statistically significant differences ($p > 0.05$) were found for the level of damage between the altitude categories of the PU's. This is probably because red squirrels have a wide range of geographic distribution, both longitudinally and altitudinally (Linares, 1998), as is the case with cocoa (López *et al.*, 2014); besides, they are rodents that, being r-selected species, are adapted to exploit the available resources to the maximum, regardless of whether they are in a variable range of climates, to guarantee a large progeny (Krebs, 1985). This result contrasts with that of López *et al.*, (2014) who found that damage by squirrels varies according to the altitudinal range in which the PU's included in their study were located, and concluded that the damage is greater in crops located between 200 and 300 m.a.s.l.

No differences ($p > 0.05$) were found for the level of damage between the size categories of the cocoa plots. This may be because PU size tends to be small and that squirrels have high mobility (Zollner, 2000). In fact, in the Mesa Bolívar-El Bordo area, in Río Frío and in Zea, approximately two-thirds of them have less than 2 ha of surface, meanwhile in Santo Tomás and Mesa Julia, two-thirds of the UP have between 3 and 5 ha.

embargo, Lee (1997) encontró que ardillas del género *Callosciurus* causan mayor daño a las mazorcas localizadas cerca de los bosques en India. Las ardillas de la familia Sciuridae exhiben diferentes rangos perceptuales (distancia máxima desde la que un animal puede detectar la presencia de un parche de hábitat); por ejemplo las ardillas grises (*Sciurus carolinensis*) tienen un rango perceptual de 300 m y las ardillas zorro (*Sciurus niger*) de 400 m (Zollner, 2000).

Tampoco se encontraron diferencias en el nivel de daño entre las cuatro categorías de vegetación aledaña. Sin embargo, las observaciones de campo (Figura 3) indican que no existe daño cuando los cultivos de cacao están rodeados por pastos, mientras que el daño es evidentemente mayor cuando están rodeados por bosques secundarios.

El menor daño observado en los cultivos rodeados por pastos puede deberse a que el movimiento de las ardillas allí es limitado porque las ardillas son presas de varias especies de aves, mamíferos y reptiles, y suelen evadir los lugares donde el riesgo de depredación es alto (Krijger *et al.*, 2017; Potash *et al.*, 2019).

El mayor nivel de daño encontrado en los cultivos rodeados por bosques es razonable cuando en los cultivos hay abundantes árboles de sombra que mejoran la conectividad con la vegetación montañosa (Mäkeläinen *et al.*, 2016).

No se encontraron diferencias ($p > 0,05$) en el nivel de daño entre las categorías de densidad de siembra entre las UP. Ello puede deberse a

No differences were found ($p > 0.05$) for the level of damage between the categories of distance to the forest. However, Lee (1997) found that various squirrels of the genus *Callosciurus* cause a higher level of damage to the pods of crops located near forests in India. This is because squirrels of the Sciuridae family exhibit different perceptual ranges (maximum distance from which an animal can detect the presence of a patch of habitat); for example, gray squirrels (*Sciurus carolinensis*) have a perceptual range of 300 m and fox squirrels (*Sciurus niger*) have a perceptual range of 400 m (Zollner, 2000).

Nor were found differences for the level of damage between the four categories of neighboring vegetation. However field observations (Figure 2) indicate that there is no damage when cocoa crops are surrounded by grasses and that damage is visibly less when surrounded by other PU's of cocoa, while the damage is visibly greater when they are surrounded by stubble or secondary forests.

The lower damage observed in crops surrounded by grasses may be because the movement of squirrels there is limited due to they can be exposed to predators. Since rodents play the role of prey for many species of birds, mammals and reptiles, they avoid frequenting places where the risk of predation is high (Krijger *et al.*, 2017; Potash *et al.*, 2019).

The highest level of damage found in crops surrounded by forests is reasonable when there are abundant shade trees in the crops that improve

que la mayoría de los cultivos fueron establecidos en diseños de 3 x 3 ó 3 x 4 m, de manera que existe una alta conectividad entre las plantas y por ende, la movilidad de las ardillas en su búsqueda de mazorcas de cacao se ve facilitada (Daghela *et al.*, 2013).

connectivity to the mountainous vegetation (Mäkeläinen *et al.*, 2016).

No differences were found ($p > 0.05$) for the level of damage between the categories of planting density among the PU's. This may be because most of the crops in the study area were

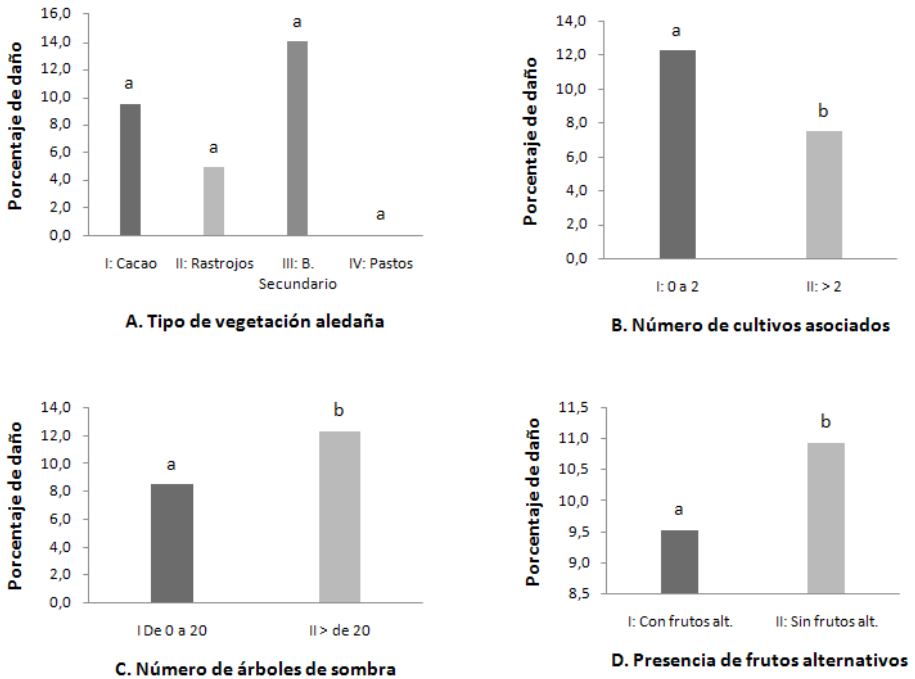


Figura 3. Relación entre el nivel de daño y el tipo de vegetación aledaña (3A), el número de cultivos asociados (3B), el número de árboles de sombra (3C) y la presencia de frutos alternativos (3D). Barras con letras distintas muestran diferencias significativas ($p < 0.05$).

Figure 3. Relationship among the level of damage and the kind of neighboring vegetation (3A), the number of associated crops (3B), and the presence of alternative fruits (3D). Bars with different letters show significant differences ($p < 0.05$).

No se detectaron diferencias ($p > 0,05$) en el nivel de daño entre los cultivos con dos variedades y aquellos con tres variedades de cacao. Los productores, al momento de establecer sus cultivos compran las plantas en viveros o construyen sus propios viveros con semillas de la zona, sin que haya un experto que haga selección genética. Como consecuencia, los cultivos tienen diferentes proporciones de cacao criollo, forastero e híbrido, lo que ya es característico de toda la región (Chacón *et al.*, 2007, Salazar, 2016).

El nivel de daño difiere ($p < 0,05$) entre los dos grupos de cultivos asociados. En la Figura 3 se puede apreciar que el nivel de daño se reduce en la medida en que aumenta el número de cultivos asociados. Ello puede ser producto de que, por un lado, una mayor cantidad de cultivos mejora la complejidad estructural de la vegetación (Flaherty *et al.*, 2012; Garcés-Restrepo *et al.*, 2013; Gregory *et al.*, 2017; Holloway *et al.*, 2012) creando un hábitat más favorable para las ardillas, y por el otro, entre los cultivos asociados hay frutos alternativos (Reher *et al.*, 2016) como es el aguacate.

No se detectaron diferencias ($p > 0,05$) en el nivel de daño entre las categorías de uso de agroquímicos para el control de las arvenses. Las ardillas son animales arborícolas (Linares, 1998) de modo que la estructura del estrato herbáceo no es un factor determinante.

El nivel de daño fue diferente ($p < 0,05$) entre las categorías de árboles de sombra. En la Figura 3

established in 3 x 3 or 3 x 4 m designs, both among plants and among rows, so that there is high connectivity between plants and therefore, the mobility of squirrels in their search for cocoa pods is facilitated (Daghela *et al.*, 2013).

No differences ($p > 0.05$) were detected for the level of damage between crops with two varieties and those with three cocoa varieties. This is for the reason that in the study area, the producers, to establish their crops, buy the plants in nurseries or build their own nurseries with seeds from the area, without an expert selecting the seeds according to their genetics. Consequently, in either case, the crops will have different proportions of criollo, forastero and hybrid cocoa, as is common throughout the region (Chacón *et al.*, 2007, Salazar, 2016).

The level of damage differs ($p < 0.05$) between the two groups of associated crops compared. In Figure 3 it can be seen that the level of damage is reduced as the number of associated crops increases. This may be due, on the one hand, to the fact that a greater number of crops improves the structural complexity of the vegetation (Flaherty *et al.*, 2012; Garcés-Restrepo *et al.*, 2013; Gregory *et al.*, 2017; Holloway *et al.*, 2012) creating a more favorable habitat for squirrels, and on the other because among the associated crops there are alternative fruits (Reher *et al.*, 2016) such as the avocado.

No differences were found ($p > 0.05$) for the level of damage between the categories of use of agrochemicals for weed control. Because squirrels are

puede observarse que el nivel de daño aumenta en la medida en que aumenta la cantidad de árboles.ha⁻¹. La vegetación de sombra contribuye a conformar una mayor complejidad estructural que favorece la presencia y la movilidad de las ardillas a través de las ramas (Alvarenga y Talamoni, 2006; Flaherty *et al.*, 2012; Garcés-Restrepo *et al.*, 2013; Gregory *et al.*, 2017; Holloway *et al.*, 2012; Reunanen, 2001), así como la construcción de nidos (Holloway y Malcolm, 2007). Smith y Nott (1988) encontraron que las ardillas encuentran protección en los cultivos con mayor cobertura de sombra. Monge e Hilje (2006) explicaron que la ardilla *Notosciurus variegatoides* varía su dieta en función de la arquitectura de los árboles, lo que a su vez determina su protección y el acceso a los alimentos. Cuautle (2007) señala que las ardillas requieren ciertas condiciones de macrohábitat y microhábitat para su establecimiento. Por otro lado, Wilson (2008) asoció la complejidad multidimensional en la vegetación boscosa con la abundancia de la ardilla *Glaucomys sabrinus*.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) para el nivel de daño entre las UP con frutos alternativos y aquellas sin ellos. En la Figura 3 se observa que el nivel de daño es mayor en los cultivos que tienen frutos alternativos. Las semillas de cacao por sí solas no parecen representar una dieta completa para los roedores por lo que el nivel de daño está relacionado con la presencia de árboles con frutos alternativos (Monge e Hilje, 2006; Singleton, 2015). En este sentido, Reher *et al.* (2016) señalan

arboreal animals (Linares, 1998), the structure of the herbaceous stratum is not a determining factor.

The level of damage was different ($p < 0.05$) between the shade tree categories. In Figure 3 it can be observed that it increases as the number of trees.ha⁻¹ increases. The shade vegetation contribute conforming a greater structural complexity that favors the presence and mobility of squirrels through the branches (Flaherty *et al.*, 2012; Garcés-Restrepo *et al.*, 2013; Gregory *et al.*, 2017; Holloway *et al.*, 2012; Reunanen, 2001), as well as the construction of nests (Holloway and Malcolm, 2007). Smith and Nott (1988) found that squirrels find protection in cocoa crops with greater shade coverage. Monge and Hilje (2006) explained that the squirrel *Sciurus variegatoides* varies its diet depending on the architecture of the trees, which in turn determines its protection and access to food. Cuautle (2007) points out that squirrels require certain macrohabitat and microhabitat conditions for their establishment. On the other hand, Wilson (2008) found that forests that support greater multidimensional complexity in vegetation exhibit greater abundances of the squirrel *Glaucomys sabrinus*.

Statistically significant differences ($p < 0.05$) were found for the level of damage between PU with alternative fruits for squirrels and those without them. In Figure 3 it is observed that the level of damage is higher in crops with alternative fruits. Cocoa beans by themselves do not seem to represent a complete diet for these

que la abundancia de las ardillas rojas de Eurasia (*Sciurus vulgaris*) guarda relación con la existencia de fuentes mayores de alimentos.

Es razonable esperar que la presencia de frutos alternativos contribuya a reducir el nivel de daño, especialmente si se considera que los frutos alternativos pueden conformar casi la totalidad de la dieta de las ardillas del género *Sciurus*. Por ejemplo, en Panamá, los frutos de jobo (*Spondias mombin*) y de guácimo (*Guazuma ulmifolia* Lam.) representaron más del 90 % de la dieta de *Sciurus variegatoides* (Monge e Hilje, 2006). Sin embargo, en este estudio el mayor nivel de daño se encontró en cultivos con frutos alternativos, lo que puede deberse a que durante el trabajo de campo los árboles no tenían frutos o estos no estaban suficientemente maduros y por ende no estaban siendo consumidos por las ardillas, y a que una mayor densidad de árboles frutales puede favorecer la abundancia de ardillas al mejorar la complejidad estructural de paisaje, aumentando el nivel de daño sobre las mazorcas de cacao.

Conclusiones

De los resultados expuestos previamente se deduce que el nivel de daño es inferior al reportado para otras regiones del trópico americano, pero tiene un impacto significativo en la economía de los productores.

El nivel de daño difiere según la cantidad de cultivos asociados, según la cantidad de árboles de sombra y de acuerdo con la presencia de frutos

rodents, so the level of damage is related to the presence of trees with alternative fruits (Monge and Hilje, 2006; Singleton, 2015). In this sense, Reher *et al.* (2016) point out that the abundance of Eurasian red squirrel (*Sciurus vulgaris*) is closely related to the existence of greater sources of food.

It is reasonable to expect that the presence of alternative fruits will contribute to reducing the level of damage to cocoa pods, especially considering that alternative fruits can constitute almost the entire diet of squirrels of the genus *Sciurus*. For example, in Panamá, the fruits of jobo (*Spondias mombin*) and guácimo (*Guazuma ulmifolia*) represented more than 90 % of the diet of *Sciurus variegatoides* (Monge and Hilje, 2006). However, in the present study the highest level of damage was found in crops with alternative fruits, which may be due in part to the fact that during the fieldwork the availability of alternative fruits was low, that is, the trees had no fruits or these were not mature enough and therefore were not being consumed by squirrels, and on the other hand, the presence of a higher density of fruit trees may be favoring the abundance of rodents by improving the structural complexity of the landscape, increasing the level damage on cocoa pods.

Conclusions

From the results previously exposed, it can be deduced that the level of damage is lower than that reported for other regions of the American

alternativos. En conjunto, estos factores conforman la complejidad estructural de los cultivos, que figura como un elemento integrador en la determinación del nivel de daño causado por las ardillas ya que define la idoneidad de su hábitat.

Cabe destacar que el menor daño de las ardillas ocurre en las plantaciones separadas con respecto a lotes boscosos por pastizales. Con base en este descubrimiento, y sabiendo de que las ardillas son sensibles a la modificación del hábitat, es evidente la importancia que tiene el manejo agronómico de la vegetación asociada al cultivo así como la participación activa de la comunidad de productores para el control de las ardillas.

Literatura citada

- Ahrens, W.H., D.J. Cox y G. Budhwar. 1990. Use of the arcsine and square root transformations for subjectively determined percentage data. *Weed Sci.* 38(4):452-458.
- Alvarenga, C.A., y S.A. Talamoni. 2006. Foraging behaviour of the Brazilian squirrel *Sciurus aestuans* (Rodentia, Sciuridae). *Act. Ther.* 51(1):69-74.
- Bartley, B.G. 2005. The genetic diversity of cacao and its utilization. Cabi Publishing. United States of America.
- Bhat, S.K., C.P. Nair y D.N. Mathew. 1981. Mammalian pests of cocoa in South India. *Int. J. Pest Managmt.* 27:297-302.
- Boaitey, A. 2016. Quantifying spatial indicators of ecological quality in a cocoa landscape in Goaso Forest District, Ghana. M.Sc. Thesis. University of Twente. Holanda. 57 p. Disponible en: https://webapps.itc.utwente.nl/librarywww/papers_2016/msc/nrm/boaitey.pdf. Fecha de consulta: 24 de agosto de 2020.
- tropics but has a significant impact on the economy of the producers.
- The level of damage differs according to the number of associated crops, the number of shade trees, and according to the presence of alternative fruits. Together, these factors make up the structural complexity of the crops, which appears as an integrating element in determining the level of damage caused by squirrels since it defines the suitability of their habitat.
- It should be noted that the least damage by squirrels occurs in plantations separated from wooded lots by grasslands. Based on this discovery, and knowing that squirrels are sensitive to habitat modification, it is evident the importance of agronomic management of the vegetation associated with the crop, as well as the active participation of the producer community for the control of the squirrels.

End of English Version

- Chacón, I., C. Gómez y V. Márquez. 2007. Caracterización morfológica de frutos y almendras de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la región suroccidental de Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ).* 24:2020-207.
- Correa, J., S. Castro y J. Coy. 2014. Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. *Acta Agron.* 63(4):388-399.
- Coulibaly, N. 1982. Le probleme des rongeurs nuisibles a la cococulture en Cote d'Ivoire. In: Proceedings of the 8th International Cacao Research Conference, 18-23 October, 1981. Edited by J. De Lafforest, 353-355. London, England: Transla-Inter Limited.

- Cuautle, G. 2007. Diversidad de roedores en la Reserva de Biosfera La Michilía en relación con la heterogeneidad ambiental a nivel macrohábitat y microhábitat. Tesis M.Sc. Instituto de Ecología A. C. México. 84 p. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/265684923>. Fecha de consulta: 24 de julio de 2020.
- Daghela, H.B., D. Fotio, M. Yede y S. Vidal S. 2013. Shade Tree Diversity, Cocoa Pest Damage, Yield Compensating Inputs and Farmers' Net Returns in West Africa. PLoS ONE. 8(3):1-9.
- Emmandie, D. y J. Warren. 1993. Varietal taste preference for cacao *Theobroma cacao* L. by the neotropical red squirrel *Sciurus granatensis* (Humboldt). Biotropica. 25(3): 365-368.
- Flaherty, S., G. Patenaude, A. Close y P.W. Lurz. 2012. The impact of forest stand structure on red squirrel habitat use. Forestry. Pp. 437-444. Disponible en: <https://academic.oup.com/forestry/article-abstract/85/3/437/2756056>. Fecha de consulta: 27 de marzo de 2018.
- Garcés-Restrepo, M.F., y C.A. Saavedra-Rodríguez. 2013. Densidad de ardilla roja (*Sciurus granatensis*) en hábitats con diferentes coberturas vegetales en los Andes de Colombia. Mast. Neotrop. 20(2):381-386.
- Gregory, T., F. Carrasco-Rueda, A. Alonso, J. Kolowski y J.L. Deichmann. 2017. Natural canopy bridges effectively mitigate tropical forest fragmentation for arboreal mammals. Scient. Rep. 7:1-11.
- Guaricocha, G., C. Harvey, E. Somarriba, U. Krauss y E. Carrillo. 2001. Conservación de la biodiversidad en sistemas agroforestales con cacao y banano en Talamanca, Costa Rica. Agroforest. en Las Amer. 8:7-11.
- Holloway, G.L., W.P. Smith, C.B. Halpern, R.A. Gitzen, C.G. Maguire y S.D. West. 2012. Influence of forest structure and experimental green-tree retention on northern flying squirrel (*Glaucomys sabrinus*) abundance. Forest Ecol. and Managmt. 285:187-194.
- Holloway, G.L. y J.R. Malcolm. 2007. Northern and southern flying squirrel use of space within home ranges in central Ontario. Forest Ecol. and Managmt. 242:747-755.
- Huber, O., y Alarcón. 1988. Mapa de vegetación de Venezuela. Bioma-MARNR. Escala 1:200.000.
- IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- International Cocoa Organization (ICCO). 2018. Production of cocoa beans. Disponible en: <https://www.icco.org>. Fecha de consulta: 2 de mayo de 2018.
- International Cocoa Organization (ICCO). 2020. Production of cocoa beans. Disponible en: <https://www.icco.org>. Fecha de consulta: 22 de julio de 2020.
- Krebs, C.J. 1985. Ecología. Estudio de la distribución y la abundancia. Harla. México. 753 p.
- Krijger, I.M., S.R. Belmain, G.R. Singleton, P.W. Groot y P.G. Meerburg. 2017. The need to implement the landscape of fear within rodent pest management strategies. Pest Manag Sci. 73(12):2397-2402.
- La Marca, E. 1997. Origen y Evolución Geológica de la Cordillera de Mérida, Andes de Venezuela. Cuadernos de la Escuela de Geografía, Nueva Época. 1:1- 110.
- Lee, C.H. 1982. Rodent pests species and bait preferences in cocoa-coconut plantings. Mardi Res. Bull. 10:290-295.
- Lee, C.H. 1997. Field rodent population abundance and cocoa crop loss. J. trop. Agric. And Fd. Sc. 25(1):25-41.
- Linares, O. 1998. Mamíferos de Venezuela. Sociedad Conservacionista Audubón de Venezuela (Editorial). Caracas. 691 p.
- López, N., E. Flores, J. Castillo, y O. Montalvan. 2014. Plagas en Cacaotales. Municipio Siuna. Ciencia e Interculturalidad. 14:106-114.
- Mäkeläinen, S., H.J. de Knegt, O. Ovaskainen e I.K. Hainsken. 2016. Home-range use patterns

- and movements of Siberian Flying squirrel in urban forests: Effects on habitat composition and connectivity. *Mov. Ecol.* 4:1-14.
- Mendes, C.P., J.L. Koprowski y M. Galetti. 2019. Neosquirrel: a data set of ecological knowledge on neotropical squirrels. *Mammal Review.* 49(3):210-225.
- Molina, M. y J. Briceño. 2018. Magnitud del daño por ardillas (*Sciurus granatensis*) en función de la longitud, color y madurez de mazorcas de Cacao de la Cordillera de Mérida, Venezuela. *Bol. Cent. Inv. Biol. (LUZ).* 52(3):156-169.
- Mollineau, F., F. Bekele y G. García. 2008. The Neo-tropical red squirrel (*Sciurus granatensis*) as a pest of cacao (*Theobroma cacao* L.) in the International Cacao Genebank, Trinidad. *Trop. Agric. Trinidad.* 85:1-12.
- Monge, J. y L. Hilje. 2006. Hábitos alimenticios de la ardilla (*Sciurus variegatoides*), (Rodentia: Sciuridae). Nicoya, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 54(2):681-686.
- Parra, D., y C. Camejo. 2015. Reconocimiento de enfermedades de cacao en vivero y su manejo. Instituto Nacional de investigaciones Agrícolas. Disponible en: <https://www.scribd.com/document/353077041>. Fecha de consulta: 20 de agosto de 2020.
- Potash, A.D., L.M. Conner y R.A. McCleery. 2019. Vertical and horizontal vegetation cover synergistically shape prey behaviour. *Anim. Behav.* 152:39-44.
- Reher, S., K.H. Dausmann, L. Warnecke, y J.M. Turner. 2016. Food availability affects habitat use of Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in a semi-urban environment. *J. Mammal.* 97(6):1543-1554.
- Reunanen, P. 2001. Landscape responses of the Siberian Flying squirrel (*Pteromys volans*) in Northern Finland. Ph. D. Thesis. Dept. of Biology. Univ. of Oulu. 45 p. Disponible en: <http://jultika.oulu.fi/files/isbn9514264967.pdf>. Fecha de consulta: 20 de agosto de 2020.
- Salazar, G.E. 2016. Análisis de la diversidad genética del cacao venezolano resguardado en los bancos de germoplasma nacional, con miras a establecer programas de mejoramiento genético. Tesis de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 155 p. Disponible en: <http://saber.ucv.ve/handle/123456789/14808>. Fecha de consulta: 20 de agosto de 2020.
- Siegel, S., y N.J. Castellán. 2007. Estadística no paramétrica. 2da ed. Editorial Trillas. México. 437 p.
- Singleton, G.R. 2015. Rodents in agriculture and forestry. International Rice Research Institute. Pp. 33-80.
- Smith, R.H., y H.M. Nott. 1988. Rodent damage to cocoa in Equatorial Guinea. *FAO Plant Prot. Bull.* 36:119-124.
- Sokal, R., y J. Rohlf. 1995. *Biometry.* W. H. Freeman. 887 p.
- Verea, C., y A. Solórzano. 2005. Avifauna asociada al sotobosque de una plantación de cacao del norte de Venezuela. *Ornit. Neotrop.* 1:1-14.
- Vivas, L. 1992. Los Andes Venezolanos. Academia Nacional de La Historia. Italgáfica S.R.L. Caracas. 250 p.
- Warren, J. y D. Emmandie. 1993. Rodent resistance in cacao, *Theobroma cacao* L. *Trop. Agric. Trinidad.* 70:286-288.
- Warton, I.W. y F.K. Hui. 2011. The arcsin in asinine: the analysis of proportions in ecology. *Ecol.* 92(1):3-10.
- Wilson, T.M. 2008. Limiting factor for northern Flying squirrels (*Glaucomys sabrinus*) in the pacific northwest; a spatio-temporal analysis. Dr. Thesis. 207 p. Disponible en: http://www.fsl.orst.edu/rna/Documents/publications/Quinault_Limiting%20factors%20for%20northern%20flying%20squirrels%20etc.pdf. Fecha de consulta: 24 de agosto de 2020.
- Wilson, T.M. y E.D. Forsman. 2013. Thinning effects on spotted owl prey and other forest-dwelling small mammals. In: Anderson, P.D. and K.L. Ronnenberg. (Eds). Density management for the

21st century: west side story. Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-880. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station: 79–90.

Wood, B.J. y G.R. Singleton. 2014. Rodents in agriculture and agroforestry. En: Pp. 33-80. A.P. Buckle and R.H. Smith (Eds.). Rodent pests and their control. 2^{da}. Ed.

World Population Review. 2020. Cocoa producing countries 2020 by population. Disponible en: <https://worldpopulationreview.com/country-rankings/cocoa-producing-countries>. Fecha de consulta: 23 de julio de 2020.





Zollner, P.A. 2000. Comparing the landscape level perceptual abilities of forest sciurids in fragmented agricultural landscapes. Landscape Ecol. 15:523-533.

Selección de un consorcio microbiano promotor del crecimiento de plántulas de cebolla en condiciones de umbráculo

Selection of a growth promoter microbial consortium in onion seedlings under shade-house conditions

Seleção de um consórcio microbiano promotor de crescimento de mudas de cebola em casa de vegetação

Erika Lorena Blanco^{1,2,3*}, Fermín Rada², Yulimar Castro^{3,4} y Jorge Paolini⁵

¹Laboratorio de Biotecnología y Química de Polímeros (LIBQPOL). Decanato de Investigación. Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET). Apdo. 5001. San Cristóbal, Venezuela. Correo electrónico: elorenablancoc@gmail.com.  ²Instituto de Ciencias Ambientales y Ecológicas (ICAE). Postgrado en Ecología Tropical. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Apdo. 5101. Mérida, Venezuela. Correo electrónico: fradarincon@gmail.com.  ³Laboratorio de Fitobiotecnología. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes (ULA). Apdo. 5101. Mérida, Venezuela. Correo electrónico: yulimarcastromolina@gmail.com.  ⁴Laboratório de Fermentações, Programa Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidad Federal de Lavras, Apdo. 3037, Minas Gerais, Brasil. ⁵Centro de Ecología. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Apdo. 21825. 1020-A Caracas, Venezuela. Correo electrónico: mapire3000@gmail.com .

Resumen

La práctica de producir plántulas más vigorosas representa una ventaja competitiva al momento del trasplante de un cultivo, y el uso de biofertilizantes combinados son una alternativa ecológica sustentable. El objetivo de esta investigación fue seleccionar un consorcio microbiano para la producción de cebolla híbrido F1 2000 en semilleros bajo condiciones de umbráculo. Para ello se utilizaron cinco cepas rizobacterianas de los géneros *Rhizobium* (cepa ME01), *Bradyrhizobium* (cepas Leu2A y YE1), *Ochrobactrum* (cepa ES1) y *Pseudomonas* (cepa Alf), que han mostrado efectos benéficos sobre plántulas de pimentón

Recibido el 22-06-2020 • Aceptado el 08-09-2020.

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: elorenablancoc@gmail.com

y lechuga. Estas rizobacterias se inocularon de forma mixta (consorcio microbiano) en cebolla así: Alf+ES1, ME01+ES1, ES1+Leu2A, Alf+Leu2A, YE1+ES1, ME01+Alf, YE1+Alf, ME01+YE1, YE1+Leu2A, ME01+Leu2A, utilizando un suelo proveniente de San Juan de Lagunillas-Mérida, Venezuela en condiciones de umbráculo durante 60 días. Se determinaron las variables: número de hojas, diámetro de la base del pseudotallo, longitud aérea y de la raíz, peso fresco y seco aéreo y de la raíz. Adicionalmente, a las plántulas del consorcio seleccionado, se les realizó una curva de asimilación de CO₂ con diferentes niveles de luz para observar su respuesta fotosintética. El consorcio ME01 + Leu2A (*Rhizobium tropici* + *Bradyrhizobium japonicum*) fue el que incrementó todas las variables determinadas, especialmente el diámetro de la base del pseudotallo, determinante para el cultivo de cebolla, y produjo una mayor tasa de asimilación de CO₂ en las plántulas. Se propone el uso de este consorcio microbiano como una opción para la producción agrícola en condiciones de semillero.

Palabras clave: *Allium cepa* L., biofertilizantes, rizobios, tasa de asimilación de CO₂.

Abstract

The practice of producing more vigorous seedlings represents a competitive advantage at the time of transplanting a crop, and the use of combined biofertilizers are a sustainable ecological alternative. The objective of this research was to select a microbial consortium for the production of F1 2000 hybrid onion seedbeds under shade-house conditions. Five rhizobacterial strains of the genera *Rhizobium* (ME01 strain), *Bradyrhizobium* (Leu2A and YE1 strains), *Ochrobactrum* (ES1 strain) and *Pseudomonas* (Alf strain), which have shown favorable effects on pepper and lettuce seedlings. These rhizobacteria were inoculated in a mixed manner (microbial consortium) in onion as follows: Alf+ES1, ME01+ES1, ES1+Leu2A, Alf+Leu2A, YE1+ES1, ME01+Alf, YE1+Alf, ME01+YE1, YE1+Leu2A, ME01+Leu2A, using a soil from San Juan de Lagunillas-Mérida, Venezuela under shade-house conditions for 60 days. The following variables were determined: number of leaves, pseudostem base diameter, aerial and root length, aerial and root fresh and dry weight. Additionally, a CO₂ assimilation curve under different light levels was carried out on the seedlings of the selected consortium to observe their photosynthetic response. The consortium ME01 + Leu2A (*Rhizobium tropici* + *Bradyrhizobium japonicum*) increased all studied variables, especially the pseudostem base diameter, essential for onion cultivation, and yielded higher seedlings CO₂ assimilation rates. The use of this microbial consortium is recommended as an option for agricultural production under seedbed conditions.

Key words: *Allium cepa* L., biofertilizers, rhizobia, CO₂ assimilation rate.

Resumo

A prática de produzir mudas mais vigorosas representa uma vantagem competitiva no momento do transplante de uma cultura e, o uso de biofertilizantes combinados é uma alternativa ecológica sustentável. O objetivo desta pesquisa foi selecionar um consórcio microbiano para a produção de mudas de cebola híbridos F1 2000 em canteiros sob condições de casa de vegetação. Para isto, foram utilizadas cinco cepas rizobacterianas dos gêneros *Rhizobium* (cepa ME01), *Bradyrhizobium* (cepas Leu2A e YE1), *Ochrobactrum* (cepa ES1) e *Pseudomonas* (cepa Alf), que tem mostrado efeitos benéficos nas mudas de pimentão e alface. Essas rizobacterias foram inoculadas de forma misturada (consórcio microbiano) em cebola da seguinte forma: Alf+ES1, ME01+ES1, ES1+Leu2A, Alf+Leu2A, YE1+ES1, ME01+Alf, YE1+Alf, ME01+YE1, YE1+Leu2A, ME01+Leu2A, utilizando solo de San Juan de Lagunillas-Mérida, Venezuela em condições de casa de vegetação por 60 dias. Foram determinadas as variáveis: número de folhas, diâmetro da base do pseudocaule, comprimento do caule e da raiz, peso fresco e peso seco do caule e da raiz. Além disso, nas mudas de consórcio selecionado foi realizada uma curva de assimilação de CO₂ com diferentes níveis de luz para observar sua resposta fotossintética. O consórcio ME01 + Leu2A (*Rhizobium tropici* + *Bradyrhizobium japonicum*) foi quem aumentou todas as variáveis determinadas, especialmente o diâmetro da base do pseudocaule, determinante para o cultivo da cebola, e produziu uma maior taxa de assimilação de CO₂ nas mudas. É proposta a utilização deste consórcio microbiano como uma opção para a produção agrícola em condições de canteiro.

Palavras-chave: *Allium cepa* L., biofertilizantes, rizobios, taxa de assimilação de CO₂.

Introducción

Los vegetales requieren un cuidado especial durante su crecimiento inicial, bien sea para formar plántulas más vigorosas y tener más éxito durante el trasplante o para estar protegidas contra agentes fitopatógenos. Estos efectos benéficos sobre el crecimiento vegetal pueden ser producidos por la aplicación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (MPCV) que han mostrado ventajas sobre la germinación y el desarrollo de distintos semilleros (tomate, ají,

Introduction

Vegetables require special care during their initial growth, either to form more vigorous seedlings and be more successful during transplantation or to be protected against phytopathogens. These beneficial effects on plant growth can be produced by the application of plant growth promoting microorganisms (PGPM) that have shown advantages over germination and development of different seedbeds (tomato, chili pepper, lettuce, paprika) either

lechuga, pimentón) bien sea de forma individual o en consorcio, gracias a sus variados mecanismos de acción biológica (Jayashree y Jagadeesh, 2017; Blanco *et al.*, 2018; Alcedo y Reyes, 2018).

Un consorcio microbiano desde el punto de vista de la co-inoculación es una asociación de dos o más poblaciones microbianas, de diferentes géneros y especies, que interactúan sinérgicamente como una comunidad en un sistema complejo, donde todos se benefician de las actividades de los demás, mediante estilos de vida sinérgicos en los que el crecimiento y el flujo cíclico de nutrientes se conduce más efectiva y eficientemente que en poblaciones individuales (Olmedo, 2003; Ochoa-Carreño y Montoya-Restrepo, 2010; Gangaraddi y Brahmaaprakash, 2018). Los consorcios microbianos pueden resistir mejor los periodos de limitación de nutrientes debido a la diversidad metabólica disponible por la diversidad de especies, combinada con la habilidad de compartir metabolitos dentro de la comunidad. Una condición de limitación de nutrientes puede favorecer a una población minoritaria si esta tiene la habilidad metabólica capaz de sostener la supervivencia de todo el consorcio, o ante variadas condiciones de fertilidad del suelo, puede incentivarse la acción de un grupo funcional microbiano (Reyes y Valery, 2007). Esto también dependerá del éxito del *quorum sensing* (también llamado autoinducción), el cual se conoce como un mecanismo bacteriano de comunicación célula-célula en respuesta al tamaño de la población

individually or in consortium, because of its various mechanisms of biological action (Jayashree and Jagadeesh, 2017; Blanco *et al.*, 2018; Alcedo and Reyes, 2018).

From the point of view of co-inoculation, a microbial consortium is an association of two or more microbial populations, of different genera and species, that interact synergistically as a community in a complex system, where all benefit from the activities of the others, through synergistic lifestyles in which growth and the cyclical flow of nutrients are conducted more effectively and efficiently than in individual populations (Olmedo, 2003; Ochoa-Carreño and Montoya-Restrepo, 2010; Gangaraddi and Brahmaaprakash, 2018). Microbial consortia can better withstand periods of nutrient limitation due to the metabolic diversity available from species diversity, combined with the ability to share metabolites within the community. A condition of nutrient limitation can favor a minority population if it has the metabolic ability capable of sustaining the survival of the entire consortium, or in the face of various soil fertility conditions, the action of a microbial functional group can be encouraged (Reyes and Valery, 2007). This will also depend on the success of *quorum sensing* (also called autoinduction), which is known as a bacterial mechanism of cell-cell communication in response to the size of the bacterial population to regulate gene expression in order to produce some extracellular polysaccharides, enzymes degradative, antibiotics, siderophores, biofilm formation, which

bacteriana para regular la expresión genética con el objetivo de producir algunos polisacáridos extracelulares, enzimas degradativas, antibióticos, sideróforos, formación de biopelículas, lo que muestra la importancia del *quorum sensing* en comunidades bacterianas asociadas a plantas (Antoun y Prévost, 2005; Brom *et al.*, 2014; Yashaswini y Vijay Kumar, 2016).

Estudios recientes promueven el uso de consorcios con bacterias de distintos géneros como *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Paenibacillus*, para la promoción del crecimiento de trigo (Wang *et al.*, 2020), y el uso de consorcios formados por *Rhizobium*, *Enterobacter clocae* y *Pseudomonas* sp. para la promoción del crecimiento de haba bajo condiciones de estrés oxidativo (Fatnassi *et al.*, 2015).

Actualmente la cebolla es un cultivo de alto valor económico en Venezuela debido a la carencia de semillas certificadas, y a los altos costos de fertilizantes químicos y plaguicidas. Su cultivo se realiza normalmente en suelos de textura media (franco arenosos), con buen drenaje y ricos en materia orgánica para favorecer el desarrollo de las raíces y de los bulbos (Enciso *et al.*, 2019). En el estado Mérida este cultivo posee una superficie cosechada de 491,39 ha para este rubro, lo cual ubica a la región andina como una localidad importante para la siembra de cebolla en el país, con zonas semiáridas que propician las condiciones climáticas favorables para su cultivo (MPPAT, 2017).

shows the importance of *quorum sensing* in bacterial communities associated with plants (Antoun and Prévost, 2005; Brom *et al.*, 2014; Yashaswini and Vijay Kumar, 2016).

Recent studies promote the use of consortia with bacteria of different genera such as *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Paenibacillus*, for the promotion of wheat growth (Wang *et al.*, 2020), and the use of consortia formed by *Rhizobium*, *Enterobacter clocae* and *Pseudomonas* sp. for the promotion of broad bean growth under conditions of oxidative stress (Fatnassi *et al.*, 2015).

Currently, onion is a crop of high economic value in Venezuela due to the lack of certified seeds, and the high costs of chemical fertilizers and pesticides. Its cultivation is normally carried out in soils of medium texture (sandy loam), with good drainage and rich in organic matter to favor the development of roots and bulbs (Enciso *et al.*, 2019). In the state of Mérida, this crop has a harvested area of 491.39 ha for this item, which places the andean region as an important location for the planting of onions in the country, with semi-arid areas that favor favorable climatic conditions for its cultivation (MPPAT, 2017).

The objective of this research was to select an autochthonous microbial consortium from the state of Mérida that promotes plant growth, for the growth of onion seedlings under shade conditions, using soil from a semi-arid area, increasing regional and national production, as well as reducing

El objetivo de esta investigación fue seleccionar un consorcio microbiano autóctono del estado Mérida promotor del crecimiento vegetal, para el crecimiento de plántulas de cebolla en condiciones de umbráculo, utilizando un suelo proveniente de una zona semiárida, con miras a incrementar la producción regional y nacional, así como disminuir las dosis de fertilizantes químicos en campo.

Materiales y métodos

Material biológico

Se utilizaron cinco cepas rizobacterianas autóctonas del estado Mérida, pertenecientes al Laboratorio de Fitobiotecnología-ULA, que de forma individual mostraron potencial biofertilizante sobre plántulas de pimentón y lechuga (Blanco *et al.*, 2018). Las cepas usadas fueron ME01 (*Rhizobium tropici*) (Marquina *et al.*, 2011), Leu2A (*Bradyrhizobium japonicum*), YE1 (*Bradyrhizobium* spp.), ES1 (*Ochrobactrum* spp.) y Alf (*Pseudomonas fluorescens*) (Blanco *et al.*, 2018), caracterizadas como productoras de ácido indol acético, sideróforos, ácido cianhídrico, disolventes de fósforo, y antagonicas contra los fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum gloeosporioides* (Blanco y Castro, resultados no publicados).

Además, se utilizó semilla de cebolla certificada híbrido F1 2000 (casa comercial Hazera), una cebolla amarilla de día corto que ha mostrado cierta tolerancia al bajo contenido de humedad en el suelo (Estrada-Prado *et al.*, 2015).

the doses of chemical fertilizers in the field.

Materials and methods

Biological material

Five autochthonous rhizobacterial strains from the Mérida state, belonging to Laboratorio de Fitobiotecnología-ULA, which individually showed biofertilizing potential on paprika and lettuce seedlings were used (Blanco *et al.*, 2018). The strains used were ME01 (*Rhizobium tropici*) (Marquina *et al.*, 2011), Leu2A (*Bradyrhizobium japonicum*), YE1 (*Bradyrhizobium* spp.), ES1 (*Ochrobactrum* spp.) and Alf (*Pseudomonas fluorescens*) (Blanco *et al.*, 2018), characterized as producers of indole acetic acid, siderophores, hydrocyanic acid, phosphate solubilizers, and antagonists against the phytopathogens *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum gloeosporioides* (Blanco and Castro, unpublished results).

In addition, F1 2000 hybrid certified onion seed (Hazera commercial house) was used, a short-day yellow onion that has shown a certain tolerance to low moisture content in the soil (Estrada-Prado *et al.*, 2015).

Soil

Soil from the Estación Experimental del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (IIAP), from Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, ULA, located in San Juan de Lagunillas-Mérida, Sucre municipality, Mérida state, was used as it is a semi-arid area with favorable soil for growing onion. The altitude of the site is between 1050

Suelo

Se usó un suelo proveniente de la Estación Experimental del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (IIAP) de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la ULA, ubicada en San Juan de Lagunillas-Mérida, municipio Sucre, estado Mérida, por tratarse de una zona semiárida con suelo favorable para el cultivo de cebolla. La altitud del lugar se encuentra entre 1050 a 1100 msnm, y su ubicación geográfica corresponde a los 8° 31' N y 71° 22' W. Se tomó una muestra compuesta del suelo y se tamizó a través de una malla de 2,36 mm de diámetro para preparar el semillero. Las características físico-químicas del suelo se muestran en el Cuadro 1.

to 1100 masl, and its geographical location corresponds to 8° 31' N and 71° 22' W. A composite sample of the soil was taken and sieved through a 2.36 mm in diameter mesh to prepare the seedbed. The physical-chemical characteristics of the soil are shown in Table 1.

Preparation of the inoculums

The rhizobia strains grew in agarized medium yeast extract-mannitol YMA modified with 0.5 g.L⁻¹ K₂HPO₄, 0.2 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 0.1 g.L⁻¹ NaCl, 0.5 g.L⁻¹ yeast extract, 2.5 g.L⁻¹ mannitol, 7.5 g.L⁻¹ sucrose, 2.5 mg.mL⁻¹ Congo red pH 6.7-6.8 (Vincent, 1975) at 29 °C. The incubation period of the rhizobia was carried out according to the growth dynamics of each strain, until its exponential-stationary phase (24-36 h) using the

Cuadro 1. Características físico químicas del suelo proveniente de la parcela experimental del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (IIAP) de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la ULA, en San Juan de Lagunillas, estado Mérida.

Table 1. Physical-chemical characteristics of the soil from the experimental plot of the Instituto de Investigaciones Agropecuarias (IIAP) of the Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales of the ULA, in San Juan de Lagunillas, Merida state.

Textura ^a	MO ^b %	Pdisp ^c mg.kg ⁻¹	pH (1:2,5)	C.E (1:5) mS.cm ⁻¹	K ^d mg.kg ⁻¹	Ca ^d mg.kg ⁻¹	Mg ^d mg.kg ⁻¹	Rel Ca/Mg
Franco arenosa	3,61	30	6,04	0,14	568	2060	1872	0,66

^aBouyoucos; ^bMateria orgánica por Walkley y Black; ^cFósforo disponible por Bray I (0,03 M NH₄F + 0,025 M HCl); ^dCationes intercambiables por extracción con acetato de amonio 1 M pH 7,0.

^aBouyoucos; ^bOrganic matter by Walkley and Black; Bray I available phosphorus (0.03 M NH₄F + 0.025 M HCl); Exchangeable cations by extraction with 1 M ammonium acetate pH 7.0.

Preparación de los inóculos

Las cepas rizobianas crecieron en medio agarizado extracto de levadura-manitol YMA modificado con $0,5 \text{ g.L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$, $0,2 \text{ g.L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,1 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaCl}$, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ extracto de levadura, $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ manitol, $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ sacarosa, $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ rojo congo pH 6,7-6,8 (Vincent, 1975) a 29°C . El período de incubación de los rizobios se realizó según la dinámica de crecimiento de cada cepa, hasta su fase exponencial-estacionaria (24-36 h) utilizando como modelo la curva de crecimiento para rizobios determinada por Blanco *et al.* (2013) en este medio de crecimiento. Los inóculos se prepararon de forma mixta con el cultivo de cada cepa mediante el conteo celular con una cámara de Neubauer a una concentración $1 \times 10^8 \text{ cel.mL}^{-1}$ de cada cepa en solución salina 0,89 % NaCl. Se preparó un control solo con solución salina 0,89 % NaCl y sin consorcios. Seguidamente los inóculos se mantuvieron durante 20 minutos a 90 rpm en una agitadora a temperatura ambiente con la finalidad de homogenizar la suspensión celular. Los tratamientos utilizados correspondieron a los consorcios preparados (proporción 1:1), según el Cuadro 2.

Ensayo en umbráculo

Las semillas de cebolla se desinfectaron mediante lavado con solución jabonosa al 1 % (jabón en barra) durante 10 min, seguido de 5 enjuagues con agua destilada estéril, luego lavado con cloro al 1 % por 1 min, y por último, 10 enjuagues con agua destilada estéril, según protocolo estandarizado en el

growth curve for rhizobia determined by Blanco *et al.* (2013) as a model in this growth medium. The inocula were prepared in a mixed manner with the culture of each strain by means of cell counting with a Neubauer chamber at a concentration of $1 \times 10^8 \text{ cel.mL}^{-1}$ of each strain in 0.89 % NaCl saline solution. A control was prepared only with saline 0.89 % NaCl and without consortia. The inocula were then kept for 20 minutes at 90 rpm in a shaker at room temperature in order to homogenize the cell suspension. The treatments used corresponded to the prepared consortia (1:1 ratio), according to Table 2.

Shade-house experiment

The onion seeds were disinfected by washing with 1 % soap solution (bar soap) for 10 min, followed by 5 rinses with sterile distilled water, then washing with 1 % chlorine for 1 min, and finally, 10 rinses with sterile distilled water, according to standardized protocol in the Laboratorio de Fitobiotecnología. The disinfected seeds were added to the inocula of each consortium and placed under shaking at 90 rpm for 1 h. Horticultural trays of 50 cells filled with the soil of experimental station (approximately 50 g of soil per cell) were used, two seeds were sown per cell (40 seeds per treatment), they were moistened and covered with commercial sterile substrate to facilitate cotyledon emergence. The trays were kept under shade conditions (temperature 27.4°C , relative humidity 65 %, light $137 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Twenty days after cotyledon emergence, thinning was

Laboratorio de Fitobiotecnología. Las semillas desinfectadas se agregaron a los inóculos de cada consorcio y se colocaron en agitación a 90 rpm por 1 h. Se utilizaron bandejas de horticultura de 50 celdas sustentadas con el suelo de la parcela experimental a utilizar (aproximadamente 50 g de suelo por celda), se sembraron dos semillas por celda (40 semillas por tratamiento), se humedecieron y se cubrieron con sustrato comercial estéril para facilitar la emergencia cotiledonar. Las bandejas se mantuvieron en condiciones de umbráculo (temperatura 27,4 °C, humedad relativa 65 %, luz 137 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). A los 20 días de la emergencia cotiledonar se realizó un raleo dejando así una sola plántula por celda. Las plántulas se reinocularon inmediatamente cada una con 1 mL de inóculo 1×10^8 cel.mL⁻¹ del tratamiento correspondiente. El riego se realizó a capacidad de campo con frecuencia interdiaria o diaria según las condiciones ambientales. El riego nutricional se realizó con solución Hoagland (Taiz y Zeiger, 2010) dos veces por semana a capacidad de campo, fraccionando la concentración de sus nutrientes 12,5 % días 15-20, 20 % todos sus nutrientes (Ca y K 100 %) días 20-25, 25 % todos sus nutrientes (Ca y K 125 %) días 25-45, y 50 % todos los nutrientes (Ca y K 100 %) días 45-60 después de la siembra en bandejas. Esta dosificación nutricional se realizó con base en Blanco *et al.* (2018), y a sugerencias de productores agrícolas de cebolla con respecto al Ca y al K en fase de semillero, por la importancia de los mismos para la formación de

performed, thus leaving a single seedling per cell. The seedlings were immediately re-inoculated each with 1 mL of inoculum 1×10^8 cell.mL⁻¹ of the corresponding treatment. Irrigation was carried out at field capacity with interday or daily frequency depending on the environmental conditions. The nutritional irrigation was carried out with Hoagland solution (Taiz and Zeiger, 2010) twice a week at field capacity, dividing the concentration of its nutrients 12.5 % days 15-20, 20 % all its nutrients (Ca and K 100 %) days 20-25, 25 % all its nutrients (Ca and K 125 %) days 25-45, and 50 % all nutrients (Ca and K 100 %) days 45-60 after planting in trays. This nutritional dosage was used based on Blanco *et al.* (2018), and suggestions from local onion producers regarding Ca and K in the seedling phase, due to their importance for the formation of seedlings and because there is no evidence so far that these elements are facilitated due to the presence of the consortia employed (Enciso *et al.*, 2019).

The treatments were evaluated with 15 repetitions each. The trial was disassembled at 60 days and the following morphometric variables were determined: stem and root length, fresh and dry weight of stem and root, number of leaves, and the diameter of the pseudostem base, in order to study the effect of consortia on the growth of the onion in the seedling phase under controlled conditions. Additionally, for the of the control treatment and of the one selected as the most promising consortium (n = 5), a light saturation curve was performed to determine

las plántulas y debido a que no hay evidencias hasta ahora de que estos elementos sean facilitados por la presencia de los consorcios empleados (Enciso *et al.*, 2019).

their photosynthetic activity, using a portable gas exchange system (LC-Pro, ADC Bioscientific Ltd.), programming measurements between 0 and 1800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ through an artificial light

Cuadro 2. Tratamientos utilizados en el experimento (preparados en solución salina 0,89 % NaCl).

Table 2. Treatments used in the experiment (prepared in saline solution 0.89 % NaCl).

Tratamientos biológicos	Descripción
Control (sin inocular)	Sin consorcios
Alf+ES1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> + <i>Ochrobactrum</i> spp.
ME01+ES1	<i>Rhizobium tropici</i> + <i>Ochrobactrum</i> spp.
ES1+Leu2A	<i>Ochrobactrum</i> spp. + <i>Bradyrhizobium japonicum</i>
Alf+Leu2A	<i>Pseudomonas fluorescens</i> + <i>Bradyrhizobium japonicum</i>
YE1+ES1	<i>Bradyrhizobium</i> spp. + <i>Ochrobactrum</i> spp.
ME01+Alf	<i>Rhizobium tropici</i> + <i>Pseudomonas fluorescens</i>
YE1+Alf	<i>Bradyrhizobium</i> spp. + <i>Pseudomonas fluorescens</i>
ME01+YE1	<i>Rhizobium tropici</i> + <i>Bradyrhizobium</i> spp.
YE1+Leu2A	<i>Bradyrhizobium</i> spp. + <i>Bradyrhizobium japonicum</i>
ME01+Leu2A	<i>Rhizobium tropici</i> + <i>Bradyrhizobium japonicum</i>

Los tratamientos se evaluaron con 15 repeticiones cada uno. El ensayo se desmontó a los 60 días y se determinaron las siguientes variables morfométricas: longitud de tallo y raíz, peso fresco y seco de tallo y raíz, número de hojas, y el diámetro de la base del pseudotallo para estudiar el efecto de los consorcios sobre el crecimiento de la cebolla en fase de semillero bajo condiciones controladas. Adicionalmente, a las plántulas del tratamiento control y del seleccionado como el consorcio más promisorio ($n=5$), se les realizó una curva de saturación de luz para determinar su actividad fotosintética, utilizando un sistema portátil de intercambio de gases (LC-Pro, ADC Bioscientific Ltd.), programando

source and the respective equipment software; the data were processed with the Sigmaplot software. From this curve the maximum assimilation rate at light saturation was obtained.

Statistic analysis

The data were analyzed using a one-way ANOVA and the LSD test ($p<0.05$) with the Statgraphics software (Statistical Graphics Corporation, 2002). The assumption of normality and the homogeneity of variance were checked with the Bartlett test. However, the results of the variables of dry weight, fresh root weight, and diameter of the pseudostem base, were subjected to the Kruskal Wallis test with the statistical software Infostat (InfoStat Statistical Software, 2002), because the data they did not

mediciones entre 0 y 1800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a través de una fuente de luz artificial y el respectivo software del equipo; los datos se procesaron con el programa Sigmaplot. De dicha curva se obtuvo la tasa de asimilación máxima a saturación de luz.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía y la prueba LSD ($p < 0,05$) con el programa Statgraphics (Statistical Graphics Corporation, 2002). Se comprobó el supuesto de normalidad y la homogeneidad de varianzas con el test de Bartlett. Sin embargo, los resultados de las variables de peso seco, peso fresco raíz, y diámetro de la base del pseudotallo, se sometieron a la prueba de Kruskal Wallis con el programa estadístico Infostat (InfoStat Statistical Software, 2002), debido a que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas (Montgomery, 1991).

Resultados y discusión

Efecto de los consorcios sobre el crecimiento de las plántulas de cebolla

En el cuadro 3 se pueden observar los efectos de la compatibilidad consorcios-cultivo. En este sentido, los consorcios promisorios para las variables de crecimiento determinadas fueron ME01+YE1, YE1+Leu2A, y ME01+Leu2A, debido a que incrementaron significativamente ($p < 0,05$) las variables: número de hojas, longitud (total, raíz y aérea), pesos fresco y seco (raíz y aéreo), así como el diámetro de la base del

meet the assumptions of normality and homogeneity of the variances (Montgomery, 1991).

Results and discussion

Effect of consortia on the growth of onion seedlings

Table 3 shows the effects of the compatibility among microbial consortia and crop. In this sense, the promising consortia for the growth variables determined were ME01 + YE1, YE1 + Leu2A, and ME01 + Leu2A, due to the significant increase ($p < 0.05$) of the variables: number of leaves, length (total, root and aerial), fresh and dry weights (root and aerial), as well as the diameter of the pseudostem base, above the other consortia tested and the control (without inoculating). On the other hand, the Alf + ES1, ME01 + Alf, and YE1 + Alf consortia did not exert any effect on the seedlings, since the values in the determined variables did not show significant differences with respect to the non-inoculated control.

Of these consortia, the ME01 + Leu2A stood out, consisting of a *Rhizobium tropici* strain and a *Bradyrhizobium japonicum* strain respectively, for its positive effect on the increase of all the variables determined, especially the diameter of the base of the pseudostem or neck (increase in up to 300 %), which corresponds to the beginning of the thickening of the bulb. This parameter is decisive in onion cultivation, since the time of transplantation depends on the thickness of the neck to avoid the formation of bulbs of poor

pseudotallo, por encima de los otros consorcios probados y del control (sin inocular). Por otro lado, los consorcios Alf+ES1, ME01+Alf, y YE1+Alf, no ejercieron ningún efecto sobre las plántulas, ya que los valores en las variables determinadas no muestran diferencias significativas respecto al control no inoculado.

De estos consorcios destacó el ME01+Leu2A, formado por una cepa de *Rhizobium tropici* y una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* respectivamente, por su efecto positivo sobre el incremento de todas las variables determinadas, especialmente el diámetro de la base del pseudotallo o cuello (incremento de hasta 300 %), lo que significa el comienzo del engrosamiento del bulbo. Este parámetro es determinante en el cultivo de cebolla, ya que el momento del trasplante depende del grosor del cuello para evitar la formación de bulbos de mala calidad (Enciso *et al.*, 2019). Nuevos reportes han mostrado efectos positivos sobre el incremento de parámetros de crecimiento sobre plántulas de cebolla inoculadas, aunque de forma individual, con cepas bacterianas de la especie *Bacillus megaterium* y los géneros *Leifsonia* sp. y *Pantoea* sp., las cuales incrementaron los pesos fresco y seco total, y las longitudes aérea y de raíz a las 7 semanas de inoculadas y con dosis 50 % de fertilizante, pero en este mismo estudio los consorcios probados no ejercieron ningún efecto sobre las variables de crecimiento (Samayoa *et al.*, 2020), a diferencia de lo observado en la presente investigación con el consorcio ME01+Leu2A.

quality (Enciso *et al.*, 2019). New reports have shown positive effects on the increase of growth parameters on onion seedlings inoculated, although individually, with bacterial strains of the species *Bacillus megaterium* and the genera *Leifsonia* sp. and *Pantoea* sp., which increased the total fresh and dry weights, and the aerial and root lengths at 7 weeks after inoculation and with a 50 % fertilizer dose, but in this same study the tested consortia did not exert any effect on the growth variables (Samayoa *et al.*, 2020), unlike what was observed in the present investigation with the ME01 + Leu2A consortium.

The evaluation of these strains in the form of a consortium made it possible to determine among which there was a synergistic effect, as proposed by Blanco *et al.* (2018), specifically for the onion hybrid used.

Additionally, and in physiological terms, it was possible to observe the photosynthetic activity of the seedlings of the ME01 + Leu2A consortium as a measure of the good metabolic state in the seedling phase for the onion at 60 days after sowing (figure 1). Table 4 shows the ecophysiological variables calculated for the control treatments (without inoculation) and the ME01 + Leu2A consortium, from the equation determined with the curves. However, as it was not possible to establish statistical comparisons between both treatments from the curves, the five maximum values of CO₂ assimilation in both treatments were compared and significant differences were observed between them ($p < 0.05$), being greater for the consortium (13.2

Cuadro 3. Efecto de los consorcios sobre las variables evaluadas a nivel de semillero en cebolla (*Allium cepa*).

Table 3. Effect of consortia on the evaluated variables at the seedbed level in onion (*Allium cepa*).

Tratamientos biológicos	Número de hojas	Diámetro de la base del pseudotallo (mm)	Longitud total (cm)	Longitud aérea (cm)	Longitud raíz (cm)	Peso fresco raíz (g)	Peso fresco aéreo (g)	Peso seco raíz (g)	Peso seco aéreo (g)
Control (sin inocular)	3,47 ^d	0,80 ^l	27,6g	25,6 ^g	2,00 ^f	0,04 ^b	0,67 ^a	0,003 ^{def}	0,05 ^f
Alf+ES1	3,60 ^{cd}	1,15 ^d	29,1g	26,4 ^{de}	2,70 ^{ef}	0,03 ^b	0,69 ^{de}	0,003 ^{ef}	0,05 ^{ef}
ME01+ES1	3,93 ^{abc}	2,27 ^{bc}	31,57 ^{cd}	29,5 ^{bc}	2,07 ⁱ	0,03 ^b	0,96 ^{bc}	0,002 ^f	0,06 ^{def}
ES1+Leu2A	3,93 ^{abc}	2,59 ^{ab}	31,97 ^{def}	29,03 ^{cd}	2,93 ^{def}	0,04 ^b	1,00 ^{bc}	0,003 ^{def}	0,07 ^{bcde}
Alf+Leu2A	3,93 ^{abc}	1,92 ^c	33,1 ^{cab}	30,03 ^{abc}	3,07 ^{ef}	0,07 ^a	1,04 ^{bc}	0,004 ^{bcd}	0,07 ^{bcd}
YE1+ES1	4,06 ^{ab}	2,26 ^{bc}	33,97 ^{bcde}	30,17 ^{abc}	3,80 ^{abc}	0,07 ^a	1,04 ^{bc}	0,005 ^{abc}	0,07 ^{bcde}
ME01+Alf	3,73 ^{bcd}	2,03 ^c	34,17 ^{bcde}	30,43 ^{abc}	3,73 ^{bcd}	0,06 ^a	0,90 ^{de}	0,004 ^{cde}	0,06 ^{def}
YE1+Alf	3,47 ^d	2,09 ^c	34,7 ^{bcd}	30,84 ^{abc}	3,86 ^{bcd}	0,07 ^a	0,91 ^{cd}	0,005 ^{bcde}	0,06 ^{def}
ME01+YE1	4,13 ^b	2,27 ^{bc}	36,1 ^{abc}	31,3 ^{abc}	4,80 ^{ab}	0,06 ^a	1,16 ^{ab}	0,017 ^{ab}	0,15 ^{ab}
YE1+Leu2A	4,13 ^b	2,35 ^{bc}	36,13 ^{ab}	32,53 ^a	3,60 ^{cd}	0,06 ^a	1,36 ^a	0,004 ^{bcde}	0,09 ^a
ME01+Leu2A	4,00 ^{ab}	3,20 ^a	38,4 ^a	32,17 ^{ab}	6,23 ^a	0,07 ^a	1,18 ^{ab}	0,017 ^a	0,08 ^{abc}

a, b, c, d, e, f Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) para un nivel de confianza del 95 %.

a, b, c, d, e, f Different letters indicate significant differences (p <0.05) for a confidence level of 95%.

La evaluación de estas cepas en forma de consorcio permitió determinar entre cuáles hubo un efecto sinérgico, como fue

± 0.2 μmol CO₂.m⁻².s⁻¹) and lower for the control (11.5 ± 0.1 μmol CO₂.m⁻².s⁻¹). In turn, the CO₂ assimilation rates (Table 3) are higher than those

propuesto por Blanco *et al.* (2018), específicamente para el híbrido de cebolla utilizado.

Adicionalmente, y en términos fisiológicos, se pudo observar la actividad fotosintética de las plántulas del consorcio ME01+Leu2A como una medida del buen estado metabólico en fase de semillero para la cebolla a los 60 días después de la siembra (figura 1). En el cuadro 4 se pueden observar las variables ecofisiológicas calculadas para los tratamientos control (sin inocular) y consorcio ME01+Leu2A, a partir de la ecuación determinada con las curvas. Sin embargo, como no fue posible establecer comparaciones estadísticas entre ambos tratamientos a partir de las curvas, se compararon los cinco valores máximos de asimilación de CO₂ en ambos tratamientos y se observaron diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$), siendo mayores para el consorcio ($13,2 \pm 0,2 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) y menores para el control ($11,5 \pm 0,1 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). A su vez, las tasas de asimilación de CO₂ (cuadro 3) son superiores a las descritas para plántulas de cebolla sin inocular en otros estudios (Jasoni *et al.* 2004; Bhatt *et al.* 2004; Bachie *et al.* 2019) y similares a las reportadas por Wheeler *et al.* (2004), estas últimas de un estado fenológico más avanzado de las plantas y de igual forma no inoculadas. Esto sugiere que el consorcio microbiano ME01+Leu2A podría producir incremento de la biomasa en

described for onion seedlings without inoculation in other studies (Jasoni *et al.* 2004; Bhatt *et al.* 2004; Bachie *et al.* 2019) and similar to those reported by Wheeler *et al.* (2004), the latter of a more advanced phenological state of the plants and in the same way not inoculated. This suggests that the microbial consortium ME01 + Leu2A could produce an increase in biomass in onion plants compared to non-inoculated plants, since a higher rate of assimilation of CO₂, together with similar respiratory rates between treatments, would lead to an increase in the carbon availability for growth and therefore a possible higher yield of the onion in the field. In this regard, Castro and Blanco (2018) determined that some of these same microbial consortiums inoculated in paprika plants favored chlorophyll production and that this was related to the foliar nitrogen content, thus demonstrating the benefits of PGPM on photosynthetic capacity.

It should be mentioned that the bacterial strains respond not only to the characteristics and type of soil (Reyes and Valery, 2007) or to the plant species (Blanco *et al.*, 2018), but also to the variety of the same plant species (Blanco and Reyes, 2018). In relation to this approach, it was observed that the use of some of the consortia used in the present investigation, in paprika plants, also yielded positive results, the most promising consortium being ME01 + YE1 (Castro and Blanco, 2018). Therefore, it was verified that there is a strain-strain and strain-culture specificity and compatibility, in response to the plant-microorganism-

plantas de cebolla en comparación a plantas no inoculadas, puesto que una mayor tasa de asimilación de CO₂, junto a tasas respiratorias similares entre tratamientos, conllevaría a un aumento en la disponibilidad de carbono para el crecimiento y por ende a un posible mayor rendimiento de la cebolla en campo. Al respecto, Castro y Blanco (2018) determinaron que algunos de estos mismos consorcios microbianos inoculados en plantas de pimentón favorecieron la producción de clorofila y que esto estuvo relacionado con el contenido de nitrógeno foliar, demostrando así los beneficios de los MPCV sobre la capacidad fotosintética.

soil interaction, according to the biochemical, physiological and ecological relationship between these factors, due to the variety of radical exudates that can be expressed, as mentioned by Blanco *et al.* (2018). However, the positive effect on plant growth is common with the presence of strain ME01, which individually also promoted the growth of paprika and lettuce seedlings (Blanco *et al.*, 2018).

Similarly, the plant growth promoting effect produced by the ME01 + Leu2A consortium could be due to the inorganic phosphate solubilization mechanisms and indole acetic acid production shown by these same strains (Marquina *et al.*, 2018), to the nitrate reductase activity of both strains, and

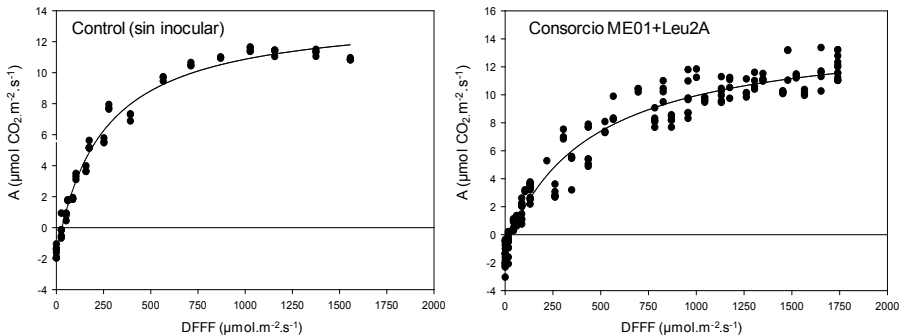


Figura 1. Curvas de saturación de luz realizada a las plántulas a los 60 dds en condiciones de umbráculo. Densidad de flujo fotónico fotosintético (DFFF) Vs. Tasa de asimilación de CO₂ (A). Control (sin inocular): $[A = 13,88 * (-29,64 + DFFF) / (-29,64 + 269,07 + DFFF); R^2 = 0,986]$. Consorcio ME01+Leu2A: $[A = 14,65 * (-32,01 + DFFF) / (-32,01 + 459,50 + DFFF); R^2 = 0,956]$.

Figure 1. Light saturation curves performed on the seedlings at 60 dds under shade conditions. Photosynthetic photon flux density (DFFF) vs. CO₂ assimilation rate (A). Control (uninoculated): $[A = 13.88 * (-29.64 + DFFF) / (-29.64 + 269.07 + DFFF); R^2 = 0.986]$. Consortium ME01 + Leu2A: $[A = 14.65 * (-32.01 + DFFF) / (-32.01 + 459.50 + DFFF); R^2 = 0.956]$.

Cuadro 4. Variables fotosintéticas determinadas a partir de las ecuaciones de las curvas de saturación de luz en plántulas con 60 dds en condiciones de umbráculo.

Table 4. Photosynthetic variables determined from the equations of the light saturation curves in seedlings with 60 dds under shade conditions.

Variable	Unidades	Control (sin inocular)	Consorcio ME01+Leu2A
Punto de compensación de luz	$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	29,6	32,0
Punto de saturación de luz	$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	800	1200
A_{max}	$\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	11,4(11,5)	11,9 (13,2)
Eficiencia cuántica	-	0,037	0,034
Respiración en oscuridad	$\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	1,25	1,20

A_{max} = tasa de asimilación de CO_2 máxima a una radiación de $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; tasa máxima absoluta entre paréntesis, $n=5$.

A_{max} = maximum CO_2 assimilation rate at a radiation of $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; absolute maximum rate in parentheses, $n = 5$.

Cabe mencionar que las cepas bacterianas responden no solo a las características y tipo de suelo (Reyes y Valery, 2007) o a la especie vegetal (Blanco *et al.*, 2018), sino también a la variedad de una misma especie vegetal (Blanco y Reyes, 2018). Con relación a este planteamiento, se pudo observar que el uso de algunos de los consorcios utilizados en la presente investigación, en plantas de pimentón, también arrojaron resultados positivos, siendo el consorcio más promisorio el ME01+YE1 (Castro y Blanco, 2018). Por lo tanto, se comprobó que existe una especificidad y compatibilidad cepa-cepa y cepas-cultivo, en respuesta a la interacción planta-microorganismo-suelo, de acuerdo a la relación bioquímica, fisiológica y

the urease activity of strain ME01 (Y. Castro and E.L. Blanco, personal observations). Other studies have shown the phytostimulant effect of rhizobia to promote the growth of non-legume plants, through the production of phytohormones, siderophores, inorganic phosphate solubilization, or as biocontrol agents against phytopathogens, thus highlighting that rhizobia have a high bio-fertilizing potential for horticultural crops of commercial interest (García-Fraile *et al.*, 2012; Santillana *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2019; Borges *et al.*, 2019).

Likewise, the importance of previously evaluating the strains with the culture to be treated, and taking into account the previous

ecológica entre estos factores, debido a la variedad de exudados radicales que puedan expresarse, como lo mencionaron Blanco *et al.* (2018). Sin embargo, el efecto positivo sobre el crecimiento vegetal es común con la presencia de la cepa ME01, la cual de forma individual también promovió el crecimiento de plántulas de pimentón y lechuga (Blanco *et al.*, 2018).

Igualmente, el efecto promotor del crecimiento vegetal producido por el consorcio ME01+Leu2A pudo deberse a los mecanismos de disolución de fosfatos y producción de ácido indol acético mostrados por estas mismas cepas (Marquina *et al.*, 2018), a la actividad nitrato reductasa de ambas cepas, y a la actividad ureasa de la cepa ME01 (Y. Castro y E.L. Blanco, observaciones personales). Otros estudios han mostrado el efecto fitoestimulante que presentan los rizobios para promover el crecimiento de plantas no leguminosas, mediante la producción de fitohormonas, sideróforos, disolución de fosfatos, o como agentes de biocontrol contra fitopatógenos, destacando así que los rizobios tienen una alto potencial biofertilizante para cultivos hortícolas de interés comercial (García-Fraile *et al.*, 2012; Santillana *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2019; Borges *et al.*, 2019).

Asimismo, se destaca la importancia de evaluar previamente las cepas con el cultivo a tratar, y tener en cuenta la caracterización previa que debe realizarse a cada microorganismo para determinar su tolerancia a temperaturas, pH y salinidad, además de verificar el establecimiento de

characterization that must be carried out on each microorganism to determine its tolerance to temperatures, pH and salinity, in addition to verifying the establishment of synergy with the plant species. In this case, it is no coincidence that the consortium that best interacted with onion seedlings is composed of two microorganisms from soils in semi-arid areas such as San Juan de Lagunillas and El Vigía, with physical-chemical conditions similar to those of the soil from which the one used in this trial came from (table 1), and with a wide range of tolerance to temperatures, pH and soil salinity (Marquina *et al.*, 2011), which would allow it to adapt to other climatic conditions for the production of the inoculum from the ME01 + Leu2A consortium and its use in other regions of the country.

In this way and in accordance with Jayashree and Jagadeesh (2017) and Blanco *et al.* (2018), the use of microbial consortia that promote plant growth is proposed as an innovative approach for the production of vigorous and healthy seedlings with greater chances of success after transplantation in crop production, and that allows the reduction of chemical fertilizers in plant crops.

Conclusions

The microbial consortium ME01 + Leu2A (*Rhizobium tropici* + *Bradyrhizobium japonicum*) increases or stimulates the greater growth of onion seedlings reflected in the

sinergia con la especie vegetal. En este caso, no es casualidad que el consorcio que mejor interactuó con las plántulas de cebolla, esté compuesto por dos microorganismos provenientes de suelos de zonas semiáridas como San Juan de Lagunillas y El Vigía, con condiciones físico químicas similares a las del suelo de donde provenía el que se usó en este ensayo (cuadro 1), y con un amplio rango de tolerancia a temperaturas, pH y salinidad del suelo (Marquina *et al.*, 2011), que le permitiría adaptarse a otras condiciones climáticas con fines de producción del inóculo del consorcio ME01+Leu2A y su uso en otras regiones del país.

De esta forma y en concordancia con Jayashree y Jagadeesh (2017) y Blanco *et al.* (2018), se propone el uso de consorcios microbianos promotores del crecimiento vegetal como un enfoque innovador para la producción de plántulas vigorosas y saludables con mayores posibilidades de éxito luego de un trasplante en la producción de hortalizas, y que permitan reducir el uso de fertilizantes químicos en los vegetales.

Conclusiones

El consorcio microbiano ME01+Leu2A (*Rhizobium tropici* + *Bradyrhizobium japonicum*) aumenta o estimula el mayor crecimiento de las plántulas de cebolla reflejado en las variables determinadas, especialmente en el diámetro de la base del pseudotallo. Por lo tanto, se propone como un prototipo de biofertilizante

determinadas variables, especialmente en el diámetro de la base del pseudostem. Therefore, it is proposed as a prototype of a promising biofertilizer for the development of seedlings of this plant species, and particularly when transplanted to soils under conditions of semi-arid climates and with physical-chemical characteristics similar to those shown in this research which are more favorable for the cultivation of this crop.

Recommendations

It is recommended to evaluate this microbial consortium in onion production at the field level, and study the positive effect that its application may have on growth and physiological variables, as well as on onion varieties and on soils with physical-chemical characteristics other than those evaluated in the present investigation, in such a way as to produce an inoculum with a wide range of application.

Acknowledgement

The authors thank the technical staff of the Laboratorio de Fitobiotecnología-ULA for their collaboration in the processing of plant samples, and the staff in charge of the IIAP-ULA experimental station in San Juan de Lagunillas, Mérida, for allowing us to take the soil samples for this essay. F. Rada thanks the IIE (Institute for International Education) and the Universidad de Los Andes (UniAndes) in Colombia for all the logistical and financial support provided.

promisorio para el desarrollo de plántulas de esta especie vegetal, y que particularmente se vayan a trasplantar a suelos bajo condiciones de climas semiáridos y con características físico químicas similares a las mostradas en esta investigación donde es más propicio el cultivo de este rubro.

Recomendaciones

Se recomienda evaluar este consorcio microbiano en la producción de cebolla a nivel de campo, y estudiar el efecto positivo que sobre variables de crecimiento y fisiológicas pueda tener la aplicación del mismo, así como en variedades de cebolla y en suelos con características físico químicas distintas a las evaluadas en la presente investigación, de tal manera de producir un inóculo con amplio rango de aplicación.

Agradecimiento

Los autores agradecen al personal técnico del Laboratorio de Fitobiotecnología-ULA por su colaboración en el procesamiento de muestras vegetales, y al personal encargado de la estación experimental del IIAP-ULA en San Juan de Lagunillas, Mérida, por permitir la toma de muestras del suelo para este ensayo. F. Rada agradece al IIE (Institute for International Education) y a la Universidad de Los Andes (UniAndes) en Colombia por todo el apoyo logístico y financiero otorgado.

End of English Version

Literatura citada

- Alcedo, Y. e I. Reyes. 2018. Microorganismos promotores de crecimiento en el biocontrol de *Alternaria alternata* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Bioagro*. 30(1): 59-66.
- Antoun, H. and D. Prévost. 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. p. 1-38. *In: PGPR: Biocontrol and Biofertilization* (ed. Z.A. Siddiqui). Springer, The Netherlands.
- Bachie, O.G., L.S. Santiago and M.E. McGiffen. 2019. Physiological responses of onion varieties to varying photoperiod and temperature regimes. *Agriculture*. 9: 214.
- Bhatt, R.M., N.K.S. Rao and R.V. Gowda. 2004. Genotypic variability of physiological responses to water stress in onion (*Allium cepa* L.). *Trop. Agric. (Trinidad)*. 81(4): 248-252.
- Blanco, E.L., M.E. Marquina and Y. Castro. 2013. Respuestas a la aplicación de carbamatos en dos aislados rizobianos provenientes de Mucuchíes, estado Mérida, Venezuela. *Bioagro*. 25(2): 117-128.
- Blanco, E.L., Y. Castro, A. Olivo, R. Skwierinski y F. Moronta Barrios. 2018. Germinación y crecimiento de plántulas de pimentón y lechuga inoculadas con rizobios e identificación molecular de las cepas. *Bioagro*. 30(3): 207-218.
- Blanco, E.L. e I. Reyes. 2018. Aplicación de un biostrato compuesto por microorganismos y roca fosfórica sobre el cultivo de dos variedades de lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 35: 408-434.
- Borges, C.S., E.L. Saccol de Sá, A.W. Muniz and B.D. Osorio Filho. 2019. Potencial use of *Rhizobium* for vegetable crops growth promotion. *Afr. J. Agric. Res.* 14(8): 477-483.
- Brom, S., M. Pistorio, D. Romero and G. Torres-Tejerizo. 2014. Boundaries for conjugative transfer of rhizobial

- plasmids: restraining and releasing factors. p. 43-54. *In*: Katsy, E.I. (Ed). Plasticity in Plant-Growth-Promoting and Phytopathogenic Bacteria. Springer, Rusia.
- Castro, Y. y E.L. Blanco. 2018. Estimación del contenido de clorofila y nitrógeno en plantas de pimentón inoculadas con bacterias rizosféricas. *Revista Científica UNET*. 30(1): 105-112.
- Enciso, C., P. Vera, A. Santacruz y J. González. 2019. Guía técnica del cultivo de cebolla. Proyecto Paquetes Tecnológicos. Universidad Nacional de Asunción. Paraguay. 73 p.
- Estrada-Prado, W., E. Lescay-Batista, A. Álvarez-Fonseca y Y.C. Maceo-Ramos. 2015. Niveles de humedad en el suelo en la producción de bulbos de cebolla. *Agron. Mesoam*. 26(1): 111-117.
- Fatnassi, I.C., M. Chiboub, O. Saadani, M. Jebara and S.H. Jebara. 2015. Impact of dual inoculation with *Rhizobium* and PGPR on growth and antioxidant status of *Vicia faba* L. under copper stress. *C. R. Biologies*. 338: 241-254.
- Gangaraddi, V. and G.P. Brahmprakash. 2018. Comparative evaluation of selected formulations of a microbial consortium. *Mysore J. Agric. Sci*. 52(2): 255-262.
- García-Fraile, P., L. Carro, M. Robledo, M.H. Ramírez-Bahena, J.D. Flores-Félix, M.T. Fernández, P.F. Mateos, R. Rivas, J.M. Igual, E. Martínez-Molina, A. Peix and E. Velázquez. 2012. *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: Towards and biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PLoS One*. 7(5): e38122.
- InfoStat Statistical Software. 2002. InfoStat/ Profesional Versión 2.0. Estadística y Diseño-F.C.A., Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Jasoni, R., Ch. Kane, C. Green, E. Peffley, D. Tissue, L. Thompson, P. Payton and P.W. Paré. 2004. Altered leaf and root emissions from onion (*Allium cepa* L.) grown under elevated CO₂ conditions. *Environ. Exp. Bot*. 51: 273-280.
- Jayashree, C. and K.S. Jagadeesh. 2017. Testing the effect of the microbial consortium on growth of vegetable seedlings in a Farmer's Nursery. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 6(2): 1636-1639.
- Kumar, A., V.S. Meena, P. Roy, Vandana and R. Kumarli. 2019. Role of Rhizobia for sustainable agriculture: Lab to Land. p. 129-149. *In*: A. Kumar, V. S. Meena (Eds.), *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability*, Springer Nature, Singapore.
- Marquina, M.E., N.E. González y Y. Castro. 2011. Caracterización fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela. *Rev. Biol. Trop*. 59(3): 1017-1036.
- Marquina, M.E., Y. Ramírez, y Y. Castro. 2018. Efecto de bacterias rizosféricas en la germinación y crecimiento del pimentón *Capsicum annum* L. var. Cacique gigante. *Bioagro*. 30(1): 3-16.
- Montgomery, D. 1991. Diseño y análisis de experimentos. Editorial Iberoamericana. 541 p.
- Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras (MPPAT). 2017. Disponible en: <http://censo.agriculturaproductiva.gob.ve/>. Fecha de consulta: enero 2017.
- Ochoa Carreño, D.C. y A. Montoya Restrepo. 2010. Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. *Rev. Fac. Cienc. Econ*. 17(2): N56-M29.
- Olmedo, C. 2003. Aspectos biotecnológicos de las interacciones microorganismos planta. p. 97-103. *En*: Albanesi, A., A. Anriquez, S. Luna, C. Kunst y R. Ledesma (Eds.), *Microbiología Agrícola. Un aporte de la investigación argentina*. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Argentina.
- Reyes, I. y A. Valery. 2007. Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays* L.) con *Azotobacter* spp. *Bioagro*. 19(3): 117-126.



- Samayoa, B.E., F.T. Shen, W.A. Lai and W.Ch. Chen. 2020. Screening and assessment of potential plant growth-promoting bacteria associated with *Allium cepa* Linn. *Microbes Environ.* 35(2). 10 p.
- Santillana, N., D. Zúñiga y C. Arellano. 2012. Capacidad promotora del crecimiento en cebada (*Hordeum vulgare*) y potencial antagonico de *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium etli*. *Agrociencia Uruguay.* 16(2): 11-17.
- Statistical Graphics Corporation. 2002. *Statgraphics Plus* Versión 5.1.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2010. *Plant Physiology*. Sinauer. Sunderland, MA, USA. 623 p.
- Vincent, J. M. 1975. *Manual práctico de rizobiología*. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. 74 p.
- Wang, J., R. Li, H. Zhang, G. Wei and Z. Li. 2020. Beneficial bacteria activate nutrients and promote wheat growth under conditions of reduced fertilizer application. *BMC Microbiol.* 20: 38.
- Wheeler, T.R., A.J. Daymon, J.I.L. Morison, R.H. Ellis and P. Hadley. 2004. Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ in onion (*Allium cepa*) grown at a range of temperatures. *Ann. appl. Biol.* 144: 103-111.
- Yashaswini, Ch. and S. Vijay Kumar. 2016. *Quorum sensing*. *Agrobios Newsletter.* 14(12): 120-121.

Características y rendimiento de semillas básicas de papa nativa (*Solanum goniocalyx*) obtenidas en biorreactor de inmersión temporal en condiciones de invernadero

Characteristics and yield of basic seeds of native potato (*Solanum goniocalyx*) obtained in temporary immersion bioreactor under greenhouse conditions

Características e rendimento de sementes básicas de batata nativa (*Solanum goniocalyx*) obtido em biorreator de imersão temporária em condições de estufa

Doris Marmolejo Gutarra^{1*} y Christopher P. Corpus Chagua²

¹ Facultad de Agronomía, Universidad Nacional del Centro del Perú (UNCP). Av. Mariscal Ramón Castilla N°3909, El Tambo, Huancayo 12000, Perú. Correo electrónico: dmarmolejo@uncp.edu.pe, . ² Empresa Privada Velacar Inversiones S.A.C. Av., Real s/n Colpa, Huayucachi, Huancayo 12000, Perú. Correo electrónico: christo17libra@gmail.com, .

Resumen

Se evaluó las características y rendimiento de semillas básicas de dos variedades de papa nativa peruana “Peruanita” y “Amarilla Tumbay” (*Solanum goniocalyx*), obtenidas en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) a condiciones de invernadero con la finalidad de obtener semillas de calidad de manera continua y sostenible, garantizando la producción de los agricultores y atender la demanda nacional. Se cultivaron microtubérculos y esquejes obtenidos por BIT en un área de 240 m² a 3.201 msnm con un diseño de Bloques Completamente Randomizado (BCR) de arreglo bifactorial (variedades x propágulos) de cuatro tratamientos y tres repeticiones. Las variables evaluadas fueron: supervivencia (SP) y altura de planta (AP) a los 30 días, número de tubérculos por planta (NT), diámetro de tubérculo (DT), peso de tubérculos (PT), tamaño de tubérculo (TT), color de piel del tubérculo (CP) y rendimiento en kg por 14,05 m² (R). Los tubérculos producidos de los microtubérculos destacaron frente a los esquejes en rendimiento para semilla básica, presentando un R=26,89 ± 0,483 kg.14,05 m², PT= 0,12 ±0,0036 kg y un

Recibido el 25-06-2020 • Aceptado el 24-09-2020.

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: dmarmolejo@uncp.edu.pe

DT= 22,59 ±0,451 mm; siendo la variedad “Peruanita” la más óptima en número y peso de tubérculos por planta para semilla básica. La semilla básica proveniente de microtubérculos se obtuvo en 5 meses, siendo una alternativa para garantizar una producción constante, permitiendo atender la demanda de los agricultores y abaratar los costos de producción.

Palabras clave: papa amarilla, producción de semilla, propagación *in vitro*, Biorreactores de Inmersión Temporal, microtubérculos, esquejes.

Abstract

The characteristics and yield of basic seeds of two native Peruvian potato varieties “Peruanita” and “Amarilla Tumbay” (*Solanum goniocalyx*), obtained in temporary immersion bioreactors under greenhouse conditions, were evaluated in order to obtain quality seeds in a continuous and sustainable way to guarantee farmers’ production and to meet national demand. For this purpose, microtubers and cuttings obtained by temporary immersion bioreactors (TIB) were cultivated in an area of 240 m² at 3.201 masl, a completely randomized block design was applied with a bifactorial arrangement (varieties x propagules) of 4 treatments and 3 repetitions. The variables evaluated were: survival (SP) and plant height (AP) at 30 days, number of tubers per plant (NT), tuber diameter (DT), tuber weight (PT), tuber size (TT), tuber skin color (CP) and yield in kg per 14.05 m² (R). Tubers produced from the microtubers stood out from the cuttings in yield for basic seed, presenting an R=26.89 ± 0,483 kg.14.05 m⁻², PT= 0,12 ±0,0036 kg and a TD= 22.59 ±0,451 mm; being the variety “Peruanita” the most optimal in number and weight of tubers per plant for basic seed. The basic seed coming from microtubers was obtained in 5 months, being an alternative to guarantee a constant production, allowing to take care of the demand of farmers and to lower the costs of production.

Keywords: yellow potato, seed production, *in vitro* propagation, Temporary Immersion Bioreactors, microtubers, cuttings.

Resumo

Foram avaliadas as características e rendimento das sementes básicas de duas variedades de batata nativa peruana “Peruanita” y “Amarilla Tumbay” (*Solanum goniocalyx*), obtidas em Biorreatores de Imersão Temporal em condições de estufa. O objetivo, foi obter sementes de qualidade de maneira contínua e sustentável, que garantam a produção dos agricultores, além de manter a demanda nacional. Para este trabalho, foram cultivados microtubérculos e estacas obtidos através de Biorreatores de Imersão Temporal (BIT) em uma área de 240 m² a 3201 msnm. Foi aplicado um desenho de Blocos Completamente Aleatório (BCR) com um arranjo bifatorial (variedade x propágulo) de 4 tratamentos e 3 repetições. As variáveis avaliadas foram: supervivência (SP) e altura da planta (AP) no fim de 30 dias,

numero de tubérculos (NT), diámetro de tubérculo (DT), Peso de tubérculos (PT), Tamanho de tubérculos (TT), Cor da pele do tubérculo (CP) e Rendimento em kg por 14,05 m². Os tubérculos produzidos dos microtubérculos, destacaram-se das estacas em rendimento para semente básica, apresentando um R=26,89 ± 0,483 kg.14,05 m⁻², PT= 0,12 ±0,0036 kg y um DT= 22,59 ±0,451 mm; sendo a variedade “Peruanita” a melhor em relação ao numero e peso de tubérculos por planta para semente básica. A semente básica proveniente de microtubérculos, foi obtida em 5 meses, sendo uma alternativa, que permite garantir uma produção constante, além de atender a demanda dos agricultores e diminuir os custos de produção.

Palavras-chave: Batata amarela, produção de sementes, propagação *in vitro*, Biorreactores de Imersão Temporária, estufa.

Introducción

El género *Solanum* comprende alrededor de 2.400 especies en el mundo (Ochoa, 1999). La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el tercer cultivo alimenticio más importante, debido a su gran valor nutricional, diversas propiedades medicinales y múltiples presentaciones (Arcos y Zúñiga, 2016).

En el Perú, el género está representado por ocho especies cultivadas, alrededor de 200 silvestres y 4.000 variedades comestibles (Soto *et al.*, 2014); de ellas, las variedades que se han constituido en forma natural, se les denomina papas nativas (INIA, 2002), las cuales dependen de los agricultores para su conservación y, a la vez, los agricultores dependen de ellas para satisfacer diversas necesidades (CIP, 2006).

En los últimos años, en diferentes comunidades campesinas, se viene incrementando el cultivo de papas nativas sobre los 3.000 msnm, mezcladas entre diferentes variedades (Egúsquiza, 2014), estrategia que permite reducir los efectos de la

Introduction

The genus *Solanum* comprises around 2,400 species in the world (Ochoa, 1999). The potato (*Solanum tuberosum* L.) is the third most important food crop, due to its great nutritional value, various medicinal properties and multiple presentations (Arcos and Zúñiga, 2016).

In Peru, the genus is represented by eight cultivated species, around 200 wild and 4,000 edible varieties (Soto *et al.*, 2014); of these, varieties that have grown naturally are called autochthonous potatoes (INIA, 2002), that depend on farmers for their conservation and, at the same time, farmers depend on the income generated by their commercial production (CIP, 2006).

In recent years, in different agricultural communities located above 3000 m of altitude, the cultivation of native potatoes has been increasing, mixed between different varieties (Egúsquiza, 2014). This strategy has made it possible to reduce the effects of the incidence of pests and diseases and to have

incidencia de plagas, enfermedades y tener tolerancia a las condiciones climáticas adversas, asegurando su producción frente al cambio climático (Reategui *et al.*, 2019). Asimismo, el uso de métodos ancestrales y tradicionales que implican un menor o ningún uso de pesticidas, las convierte en un alimento saludable para el consumidor (INIA, 2009), señalando al cultivo de la papa como unos de los principales en el Perú (Tapia *et al.*, 2017).

En los Andes, la obtención de los tubérculos semilla es una actividad tradicional (Egúsquiza, 2014), sin regulaciones y técnicas normadas (MINAGRI *et al.*, 2017); por lo cual, sus cultivos pueden presentar en ocasiones susceptibilidad a enfermedades (virales y bacterianas) y ataque de plagas (Tapia *et al.*, 2017), siendo un reto para los agricultores por los sobrecostos, escaso transporte y brotes de tubérculos antes de la temporada de cultivo, ocasionando pérdidas en el rendimiento y calidad de cultivos (Fano *et al.*, 2011).

En este contexto, la producción *in vitro* de semilla de papa, con calidad genética y fitosanitaria, a través de la biotecnología se convierte en una alternativa atractiva (Aragón *et al.*, 2004). Una de las técnicas que ha despertado interés para este cultivo es la formación de microtubérculos (Donnelly *et al.*, 2003; Igarza *et al.*, 2012; Tapia *et al.*, 2017) a partir del cultivo de meristemos (Igarza *et al.*, 2015) y su introducción en el programa de producción de semilla de papa viene dando una nueva alternativa en la producción del

tolerance to the adverse conditions generated by climate change, ensuring its optimal agricultural production (Reategui *et al.*, 2019). Likewise, the use of ancestral and traditional methods, with little or no application of pesticides, makes them a healthy food for the consumer (INIA, 2009), as well as one of the main crops in Peru (Tapia *et al.*, 2017).

In the Andes, obtaining tubers for seed is a traditional activity (Egúsquiza, 2014), without regulations and standard techniques (MINAGRI *et al.*, 2017), which would sometimes lead to crops susceptible to diseases and pest attacks (Tapia *et al.*, 2017). This is a challenge for farmers due to the increase in production costs, together with the problem of limitations in the availability of transport of agricultural products, as well as the sprouts of tubers before the growing season, which cause losses in the yield and quality of the harvest (Fano *et al.*, 2011).

In this context, the use of biotechnology for the *in vitro* production of potato seed, becomes an attractive alternative to obtain seeds of high genetic and phytosanitary quality (Aragón *et al.*, 2004). One of the techniques that has aroused interest for seed production is the formation of microtubers (Donnelly *et al.*, 2003; Igarza *et al.*, 2012; Tapia *et al.*, 2017), from meristems (Igarza *et al.*, 2015; Tapia *et al.*, 2017). This technique guarantees a high percentage of survival in pots in greenhouse conditions (Igarza *et al.*, 2013; Aguilar-Maradinga *et al.*, 2016) as well as in the field (Igarza *et al.*, 2016).

tubérculo semilla de este cultivo (Tapia *et al.*, 2017), garantizando un alto porcentaje de supervivencia en macetas, condiciones de invernadero (Igarza *et al.*, 2013; Aguilar-Maradinga *et al.*, 2016) y en campo (Igarza *et al.*, 2014) además de plantas con un buen desarrollo, lo que es una ventaja para la producción (Albarrán *et al.*, 2014).

Uno de los sistemas que viene demostrando gran eficiencia por su rendimiento, manejo y costo (Igarza *et al.*, 2015) son los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT), el cual permite una renovación de gases al interior del frasco de cultivo favoreciendo al crecimiento y desarrollo de los brotes (Igarza *et al.*, 2012). El número de microtubérculos por biorreactor se encuentra entre el rango de 129 y 491 (Igarza *et al.*, 2015) adecuado para multiplicación en cortos periodos de tiempo; pero a pesar de ello, aún existe poca información para la obtención de semillas básicas (Tapia *et al.*, 2017) sobre todo en condiciones de mayor escala como los invernaderos.

En los andes centrales del Perú se produce una gran variedad de papas nativas cuyo mercado principal es Lima (MINAGRI *et al.*, 2017), de ellas, se destacan las variedades “Peruanita” y “Amarilla Tumbay” (*Solanum gonyocalyx*) (INIA, 2009) cuya característica principal es el color amarillo intenso de la pulpa (CIP, 2010); las cuales, vienen incrementando su demanda en restaurantes e industrias de procesamiento en hojuelas (MINAGRI *et al.*, 2017).

al., 2014), obtaining plants with good development, which it is an advantage for production (Albarrán *et al.*, 2014).

One of the systems that has been demonstrating great efficiency due to its performance, handling and cost (Igarza *et al.*, 2015) are the Temporary Immersion Bioreactors (BIT), which allows a renewal of gases inside the culture flask favoring shoot development (Igarza *et al.*, 2012). The number of microtubers per bioreactor is between the range of 129 and 491 (Igarza *et al.*, 2015), which is adequate for multiplication in short periods of time; but despite this, there is still little information on this technique for obtaining basic seeds (Tapia *et al.*, 2017), especially on a large scale in greenhouses.

In the central Andes of Peru, a great variety of native potatoes are produced, which are mainly commercialized in Lima (MINAGRI *et al.*, 2017); Among these varieties, “Peruanita” and “Amarilla Tumbay” (*Solanum gonyocalyx*) stand out, the main characteristic of which is the intense yellow color of the pulp (INIA, 2009; CIP, 2010). The demand for these varieties has been increasing in restaurants and the potato chip industry (MINAGRI *et al.*, 2017).

Considering the great potential of native potato varieties in national commercialization and the need for information to obtain basic seeds of these varieties, the purpose of this study was to evaluate the characteristics and yield of the basic seeds of the varieties “Peruanita” and “Amarilla Tumbay”, obtained in BIT under greenhouse conditions.

Considerando el gran potencial de las variedades de papa nativa en la comercialización nacional y la necesidad de información para la obtención de semillas básicas de éstas variedades, el presente estudio se plantea el objetivo de evaluar las características y el rendimiento de las semillas básicas de las variedades “Peruanita” y “Amarilla Tumbay” obtenidas en los BIT en condiciones de invernadero.

Materiales y métodos

Ubicación

El estudio se desarrolló en las instalaciones de la empresa privada Velacar Inversiones S.A.C, ubicada a 3.201 msnm, a 12°08'02" S y 75°13'37" O, en el distrito de Huayucachi, provincia de Huancayo y departamento de Junín. El clima en la zona es templado frío-húmedo, con una temperatura media anual de 12 °C y una precipitación anual de 700 mm.

Materia prima

El material de estudio estuvo formado por microtubérculos y esquejes de tallos laterales de microtubérculos de las variedades “Peruanita” y “Amarilla Tumbay” (*Solanum goniocalyx*) obtenidos en los BIT del área de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) de Lima (Perú), provenientes de plantas madres del Centro Internacional de la Papa (CIP) sede Junín. Las condiciones de crecimiento se muestran en el Cuadro 1.

Materials and methods

Location

The study was carried out in the greenhouses of the private company Velacar Inversiones S.A.C, located at 3,201 m altitude (12° 08' 02" S and 75° 13' 37" W), in the district of Huayucachi, province of Huancayo and department of Junín. The climate in the area is temperate cold - humid, with an annual average temperature of 12 °C and an annual rainfall of 700 mm.

Raw material

The material for this study consisted of microtubers and cuttings of lateral stems of microtubers of the varieties “Peruanita” and “Amarilla Tumbay” (*Solanum goniocalyx*), obtained in the BIT of the Plant Tissue Cultivation Department of the Institute of Biotechnology of the National Agrarian University La Molina (UNALM) of Lima (Peru). These varieties were obtained from mother plants of the International Potato Center (CIP), Junín headquarters. The growing conditions are shown in table 1.

Experimental design

The completely randomized blocks (BCR) design was used with a factorial arrangement (varieties x propagules) of the treatments and three repetitions. Factor A was composed of the varieties: Peruanita (a_1) and Tumbay Amarilla (a_2) and Factor B was composed of the types of propagules: Microtubers (b_1) and Cuttings (b_2). Table 2 shows the levels of each of the factors in the study.

Cuadro 1. Condiciones en la sala de crecimiento para los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) durante 30 días.

Table 1. Conditions in the growth room for temporary immersion bioreactors (BIT) for 30 days.

Fotoperiodo				
Temperatura	Horas luz	Horas oscuridad	Inmersión	Burbujeo
22 °C	16	8	3 h	4 min

Diseño Experimental

Se empleó el diseño de Bloques Completamente Randomizado (BCR) con un arreglo de dos factores (variedades x propágulos) con cuatro tratamientos y tres repeticiones. El Factor A fue compuesto por las variedades: Peruanita (a_1) y Amarilla Tumbay (a_2) y el Factor B compuesto por los tipos de propágulos: Microtubérculos (b_1) y Esqueje (b_2). El Cuadro 2 muestra los niveles de cada uno de los factores en el estudio.

Establishment

The study was developed during the period from December 2018 to May 2019. Once the microtuber and cuttings had roots and a height of 15 cm, they were placed in the greenhouse, in a total area of 240 m² (beds plus paths). The transplantation of the seedlings was carried out in beds with a 10 cm height of substrate composed of a ratio of 2: 1 m³ of black earth and sawdust (Figure 1).

After a month, the seedlings were taken out of the trays with all their

Cuadro 2. Niveles de los factores en estudio para la obtención de las interacciones.

Table 2. Levels of the factors to study.

Factores		Combinación
A	VARIETADES	a_1 = Peruanita a_2 = Amarilla Tumbay
B	PRÓPAGULOS	b_1 = Microtubérculos b_2 = Esquejes

Establecimiento

El estudio se desarrolló durante el período comprendido de diciembre 2018 a mayo 2019. Una vez que el microtubérculo y esqueje presentaron raíces y altura de 15 cm fueron instaladas

roots to ensure a good take, and transplanted into the beds with the same substrate (Figure 2).

A seeding density of 20 cm x 18 cm was handled. In the first and second hilling the same substrate was added in order to cover the

en el invernadero de la empresa privada, en un área total de 240 m² (camas demostrativas más caminos). El trasplante de las plántulas se realizó en camas con 10 cm de altura de substrato compuesto por una proporción de 2:1 m³ de tierra negra y aserrín (Figura 1).

runners and avoid losses. The first and second hilling were carried out 7 and 30 days after transplantation. The fertilization was carried out together with the first hilling, applying a mixture of chicken manure compost (50-40-95 NPK) plus fertilizer (95-175-110 NPK) in a ratio of 3:1 m³. A



Figura 1. Siembra de microtubérculos de las variedades “Peruanita” y “Amarilla Tumbay” (*Solanum goniocalyx*) en camas de tierra negra y aserrín. (a) Plántulas al inicio del estudio y (b) a los 10 días de la siembra.

Figure 1. Sowing of microtubers of the varieties “Peruanita” and “Tumbay Amarilla” (*Solanum goniocalyx*) in beds of black earth and sawdust. (a) Seedlings at the beginning of the study and (b) 10 days after sowing.

Después de un mes, las plántulas fueron sacadas de las bandejas con toda su raíz para asegurar un buen prendimiento, luego fueron colocadas en los agujeros y tapados con el mismo substrato (Figura 2).

Se manejó una densidad de siembra de 20 cm x 18 cm. En el primer y segundo aporque se agregó el mismo substrato a fin de cubrir los estolones y evitar pérdidas. El primer aporque se realizó a la semana de la instalación y el segundo al mes. La

total of 42.76 kg of this mixture was used for an experimental area of 178.60 m² (beds without paths). Foliar fertilizer applications were made on the seedlings in the first month of installation, every 15 days. Irrigation was carried out up to field capacity, with a daily frequency during the first month, and then every 3 or 4 days.

The supports (tutored or placement of wick to support the plant) of the plants were made progressively according to the

fertilización se realizó junto con el primer aporque, aplicando una mezcla preparada de compostaje de gallinaza (50-40-95 NPK) más fertilizante (95-175-110 NPK) en una proporción 3:1 m³; se utilizó un total 42,76 kg de esta mezcla para un área experimental de 178,60 m² (camas demostrativas sin caminos). Se realizó aplicaciones de abono foliar en las plántulas en el primer mes de instalación cada 15 días. Los riegos se realizaron con agua potable hasta tener el sustrato en capacidad campo, con una frecuencia de riego inter diario durante el primer mes de instalación y posterior fue entre 3 o 4 días de diferencia.

growth of all the plants. The tubers were harvested 5 months after seeding in the trays; they were stored in trays by size and variety.

Variables evaluated

The characteristics evaluated were:

-Survival (SP), it was evaluated 30 days after the installation of the seedlings by counting live and dead seedlings; it was expressed in percentage (%).

-Plant height (AP), it was measured every 15 days until 80 days (6 observations), starting one week after transplanting the seedlings, with the help of a tape measure.



Figura 2. Trasplante de las plántulas en el invernadero. (a) Plántulas de la variedad “Amarilla Tumbay” y (b) plántulas de variedad “Peruanita”.

Figure 2. Transplanting the seedlings in the greenhouse. (a) Seedlings of the variety “Amarilla Tumbay” and (b) seedlings of the variety “Peruanita”.

Los tutorados (colocación de pabalo para dar sostén a la planta) de las plantas se realizaron progresivamente tanto para las plantas provenientes del microtúbérculo y esqueje de acuerdo al crecimiento de las plantas. Los tubérculos fueron cosechados después de 5 meses de la instalación en bandejas y almacenados en bandejas por tamaños y variedades.

- Number of tubers per plant (NT), the number of tubers was counted after harvest.

-Tuber diameter (DT), it was determined in 7 tubers chosen randomly in each sample, using a digital vernier.

-Weight of tubers (PT), it was determined with a digital scale (0.1 g precision), in random samples of 20

VARIABLES EVALUADAS

Las características evaluadas fueron:

-Supervivencia (SP), se evaluó a los 30 días después de la instalación de las plántulas mediante el conteo de plántulas muertas, se expresó en porcentaje (%).

-Altura de planta (AP) a los 80 días, se comenzó a medir después de una semana de la instalación de las plántulas, con la ayuda de una guincha. Se realizó un total de 6 evaluaciones, después de 15 días cada una.

-Número de tubérculos por planta (NT), se contó la cantidad de tubérculos después de la cosecha.

-Diámetro de tubérculo (DT), se determinó en 7 tubérculos por cada muestra en forma aleatoria con el uso de un vernier digital.

-Peso de tubérculos (PT), se determinó con una balanza digital de 0,1 g de precisión, en muestras aleatorias de 20 plantas por tratamientos.

-Tamaño de tubérculo (TT), se usó los criterios de selección asociadas principalmente al tubérculo (Cadima y López, 2018; Morillo *et al.*, 2019).

-Color de piel del tubérculo (CP), se utilizó las características descritas por MINAGRI *et al.*, 2017.

El rendimiento (R), se determinó en kg en un área determinada de 14,05 m² (superficie de cada tratamiento) con la ayuda de una balanza digital (0,1 g) en todas las plantas por cada tratamiento.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de la caracterización y rendimiento fueron sometidos al análisis estadístico,

plants in each treatment.

- Tuber size (TT), the selection criteria associated mainly with the size of the tuber was used (Cadima and López, 2018; Morillo *et al.*, 2019).

-Tuber skin color (PC), the characteristics described by MINAGRI *et al.* (2017) were used.

-The yield (R) in kg, was determined in all plants for each treatment, in an area of 14.05 m² (surface of each treatment), using an electronic balance (0.1 g precision).

STATISTIC ANALYSIS

The data obtained from the characterization and yield were analyzed using the Statistical Analysis System (SAS) v. 8. Comparisons were made using the 2Ax2B factorial analysis of variance (ANOVA) and once the significant differences were determined, the Tukey test was applied (Montgomery, 2004) with a confidence level of 95 % ($\alpha = 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

CHARACTERISTICS OF THE PLANT AND TUBERS

The results of SP, AP, NT, DT and PT for the 4 treatments are shown in table 3. In the case of SP, T1 (Peruanita x Microtuber) showed 89.04 ± 0.786% and statistically significant difference with respect to the other interactions ($p < 0.05$); T1 presented the highest number of seedling survival, while T3 (Amarilla Tumbay x Microtuber), T2 (Peruanita x Cuttings) and T4 (Amarilla Tumbay x Cuttings) do not showed statistical significance between them. Montoya *et al.* (2008)

mediante el software Statistical Analysis System (SAS) versión 8. Las comparaciones se realizaron mediante el análisis de varianza factorial 2Ax2B (ANOVA) y una vez determinadas las diferencias significativas, se aplicó la prueba de comparación de Tukey (Montgomery, 2004) con un nivel de confianza del 95 % ($\alpha = 0,05$).

Resultados y discusión

Características de la planta y tubérculos

Los resultados de la SP, AP, NT, DT y PT para los 4 tratamientos se muestran en el Cuadro 3. En el caso de la SP, el T1 (Peruanita x Micro tubérculo) destaca con $89,04 \pm 0,786$ % y muestra significancia estadística con respecto a las demás interacciones ($p < 0,05$), presentando el mayor número de plántulas prendidas; los tratamientos T3 (Amarilla Tumbay x Micro tubérculo), T2 (Peruanita x Esqueje) y T4 (Amarilla Tumbay x Esqueje) no muestran significancia estadística entre ellas, pero si con el T1. Montoya *et al.* (2008) registró en la variedad Diacol Capiro, una supervivencia del 80% utilizando Microtubérculos obtenidos por el Sistema de Inmersión Temporal; de igual forma, Igarza *et al.* (2014), obtuvieron entre 84 % y 86 % de supervivencia en microtubérculos del cultivar Andinita. Los porcentajes mayores a 80 % indican que la técnica de microtubérculos por BIT permite una mejor sobrevivencia de las plantas (Cruzat, 2009).

Para el caso de la AP, el T3 (Amarilla Tumbay x Microtubérculo)

registered in the Diacol Capiro variety, a survival of 80% using microtubers obtained by temporary immersion system; likewise, Igarza *et al.* (2014), obtained between 84 % and 86 % survival in microtubers of the cultivar Andinita. Percentages greater than 80 % indicate that the BIT technique allows better plant survival (Cruzat, 2009).

In the case of PA, T3 (Amarilla Tumbay x Microtuber) presented an average of 107.82 ± 0.526 cm which was the highest and statistically different from the other interactions occupying ($p < 0.05$). On the other hand, the T4 interaction (Amarilla Tumbay x Esqueje) occupies the last place with an average of 87.16 ± 0.526 cm and presents statistically significant difference with the other interactions ($p < 0.05$). Igarza *et al.*, (2013), mentioned that the microtubers obtained from BIT have a positive impact on the development of plants; Aguilar *et al.*, (2016) indicated that Burren cultivar showed a plant length of 21 cm after 15 days.

In the case of NT (Figure 3), T1 (Peruanita x Microtuber) showed an average of 19.25 ± 0.533 , which was the highest and statistically different from the other interactions ($P < 0.05$); likewise, T3 (Amarilla Tumbay x Microtuber) with an average of 16.87 ± 0.533 , was statistically different ($P < 0.05$). By contrast, T4 (Amarilla Tumbay x Esqueje) and T2 (Peruanita x Esqueje) presented the lowest averages with 8.83 ± 0.533 and 8.05 ± 0.533 , respectively. In this regard,

presentó un promedio de $107,82 \pm 0,526$ cm y muestra significancia estadística con las demás interacciones ocupando el primer lugar ($p < 0,05$); por otro lado, la interacción T4 (Amarilla Tumbay x Esqueje) ocupa el último lugar con un promedio de $87,16 \pm 0,526$ cm y presenta significancia estadística con las demás interacciones en estudio ($p < 0,05$). Igarza *et al.*, (2013), mencionan que los microtubérculos obtenidos de BIT tienen un impacto positivo en el desarrollo de las plantas; por otro lado, Aguilar *et al.*, (2016) indican que en el cultivar Burren obtiene una longitud de planta a los 15 días de 21 cm.

Para el caso de los tubérculos (Figura 3), el NT, para el T1 (Peruanita x Microtubérculo) con un promedio de $19,25 \pm 0,533$, presenta significancia estadística con las demás interacciones ($p < 0,05$); así mismo, el T3 (Amarilla Tumbay x Microtubérculo) con un promedio de $16,87 \pm 0,533$, presenta significancia estadística con las demás interacciones ($p < 0,05$). De manera contraria, las interacciones T4 (Amarilla Tumbay x Esqueje) y T2 (Peruanita x Esqueje) ocupan los últimos lugares con promedios de $8,83 \pm 0,533$ y $8,05 \pm 0,533$ y presentan significancia estadística con las demás interacciones. Al respecto Montoya *et al.*, (2008) señalaron que en estudios realizados en la variedad Diacol Capiro se observó que al utilizar microtubérculos se obtiene 49 tubérculos por planta, siendo superior a los registrados al usar plantas *in vitro* y semilla elite

Montoya *et al.*, (2008) pointed out that in studies carried out on the Diacol Capiro variety, they observed that when using microtubers, 49 tubers were obtained per plant, being higher than those registered when using *in vitro* plants and elite seed with averages of 24 and 34 tubers per plant in the field. Likewise, MINAGRI *et al.* (2017) mentioned that the variety "Peruanita" in the field with normal seed (not microtubers) produces 23 tubers.plant⁻¹ and the variety "Amarilla Tumbay" produces 13 tubers.plant⁻¹. In the same way, INIA (2009) registered 25 tubers.plant⁻¹ and 20 tubers.plant⁻¹, respectively for the same varieties, which contrast with the results found in the present study, where "Peruanita" variety had a greater number of tubers than the variety "Amarilla Tumbay".

In DT, T1 (Peruanita x Microtuber) showed an average of 23.60 ± 0.451 mm statistically different from the other interactions ($p < 0.05$). On the other hand, T2 (Peruanita x Cuttings), with an average of 20.910 ± 0.451 mm, presented statistically significant difference with the other interactions, with the exception of T3 (Amarilla Tumbay x Microtuber), which presented an average 21.580 ± 0.451 mm. The results are similar to those obtained by Igarza *et al.*, (2013), in which, DT obtained from microtubers of the Andinita cultivar, were from 5.5 to 60 mm; likewise, García-Águila *et al.* (2016) obtained diameters of 1.6 to 2.8 cm *in vitro* plants.

con promedios de 24 y 34 tubérculos por planta en campo definitivo. Asimismo, MINAGRI *et al.* (2017) mencionaron que la variedad “Peruanita” en campo con semilla normal (no de microtubérculos) produce 23 tubérculos/planta y la variedad “Amarilla Tumbay” produce 13 tubérculos.planta⁻¹; mientras que INIA (2009) registra producciones de las mismas variedades, en 25 tubérculos.planta⁻¹ y 20 tubérculos.planta⁻¹ respectivamente, los cuales contrastan con los resultados hallados en el presente estudio, donde la variedad “Peruanita” presentó mayor número de tubérculos que la variedad “Amarilla Tumbay”.

En DT, el T1 (Peruanita x Microtubérculo) con promedio de 23,60 ± 0,451 mm, muestra significancia estadística con las demás interacciones (p < 0.05); por otro lado, la interacción T2 (Peruanita x Esqueje), con un promedio de 20,910 ± 0,451 mm, presenta significancia estadística con las demás interacciones, a excepción del T3 (Amarilla Tumbay x Microtubérculo), con un promedio 21,580 ± 0,451 mm. Los resultados están dentro de los rangos obtenidos por Igarza *et al.*, (2013); en el cual, los diámetros obtenidos de minitubérculos a partir de microtubérculos de cultivar Andinita bajo casa de cultivo fueron de 5,5 a 60 mm; asimismo, con los registros de García - Águila *et al.* (2016) donde se reportaron diámetros de 1,6 a 2,8 cm en plantas *in vitro*.

Y para el PT, el T1 (Peruanita x Microtubérculo) con promedio

For the PT, T1 (Peruanita x Microtuber) with an average 0.149 ± 0.0036 kg presented statistical difference with the other interactions (p < 0.05); while, the interactions a1b2 (Peruanita x Cuttings) and a²b² (Amarilla Tumbay x Cuttings), with averages of 0.067 ± 0.0036 and 0.066 ± 0.0036 kg, respectively, presented statistical difference with the other interactions, but not between them. According to MINAGRI *et al.* (2017), the “Peruanita” variety presented a tuber weight of 0.64 kg.planta⁻¹ compared to the “Amarilla Tumbay” variety, which presents 0.33 kg.planta⁻¹ in field plantings.

The tuber size (TT) from microtubers of the “Peruanita” variety had sizes of 79 % small, 18 % medium and 3 % large; while, for the “Amarilla Tumbay” variety 90 % was small, 9 % medium and 4 % large. In the case of TT from cuttings, the Peruanita variety produced 82 % small, 14 % medium and 1 % large; and the Amarilla Tumbay variety presented 85 % small, 14 % medium and 1 % large (Figure 4). These results are favorable for a seed production program, where the optimum is the production of small and medium-sized tubers for the benefit of the producer (handling and transportation).

The color of the tuber of the varieties “Peruanita” and “Amarilla Tumbay” for each propagule is shown in figure 5. Of the 97 % of the tubers of “Peruanita” from microtubers presented a yellow and red color, while 98 % of those from the cutting presented the same color.

0,149 ± 0,0036 kg presentó significancia estadística con las demás interacciones ($p < 0,05$); mientras que, las interacciones a_1b_2 (Peruanita x Esqueje) y a_2b_2 (Amarilla Tumbay x Esqueje), con promedios de 0,067 ± 0,0036 y 0,066 ± 0,0036 kg respectivamente, presentaron significancia estadística con las demás interacciones, pero menos entre ellas. Según MINAGRI *et al.* (2017), la variedad de papa “Peruanita” se caracteriza por presentar un peso de tubérculos de 0,64 kg.planta⁻¹ en comparación a la variedad “Amarilla Tumbay” que presenta 0,33 kg.planta⁻¹ en siembras en campo. Los resultados registrados mostraron menores pesos a campañas de campo.

The tubers of the variety “Amarilla Tumbay” from microtubers and cuttings were 100% yellow. The colors obtained for both varieties correspond to the characteristics of each variety (Gómez *et al.*, 2008; INIA, 2009; MINAGRI *et al.*, 2017).

Yield

As can be seen in table 4, the T3 (Amarilla Tumbay x Microtuber) and T1 (Peruanita x Microtubérculo), presented the maximum averages with 27.24 ± 0.483 and 26.54 ± 0.483 kg, respectively ($p < 0.05$). This indicates a good performance of the propagules obtained from microtubers.

The higher yield of propagules from microtubers (Table 5) is

Cuadro 3. Comportamiento de las características evaluadas; supervivencia de plantas a 30 días (SP), altura de planta (AP), número de tubérculos por planta (NT), diámetro de tubérculo (DT) y peso de tubérculo por planta (PT) de las variedades “Peruanita” y “Amarilla Tumbay” (*Solanum goniocalyx*) para semilla básica.

Table 3. Behavior of the evaluated characteristics; 30-day plant survival (SP), plant height (AP), number of tubers per plant (NT), tuber diameter (DT) and tuber weight per plant (PT) of the varieties “Peruanita” and “Amarilla Tumbay” (*Solanum goniocalyx*) for basic seed.

Tratamiento	SP (%)	AP (cm)	NT	DT (mm)	PT (kg)
T1	89,04 ± 0,786	a 89,32 ± 0,526	a 19,25 ± 0,533	a 23,60 ± 0,451	a 0,149 ± 0,0036
T2	84,52 ± 0,786	b 94,59 ± 0,526	b 8,05 ± 0,533	c 20,91 ± 0,451	^b _c 0,067 ± 0,0036
T3	84,77 ± 0,786	b 107,82 ± 0,526	c 16,87 ± 0,533	b 21,58 ± 0,451	b 0,092 ± 0,0036
T4	84,19 ± 0,786	b 87,16 ± 0,526	d 8,83 ± 0,533	c 18,25 ± 0,451	d 0,066 ± 0,0036

Los valores con la misma letra, dentro de cada variable, son significativamente iguales ($p < 0,05$).

Values with the same letter, within each variable, are not significantly different ($p < 0,05$).



Figura 3. Plántulas con tubérculos de las variedades de papa nativa (a) “Peruanita” y (b) “Amarilla Tumbay”.

Figure 3. Seedlings with tubers of the native potato varieties (a) “Peruanita” and (b) “Amarilla Tumbay”.

Los tamaños de tubérculo (TT) provenientes de los microtubérculos de la variedad “Peruanita” presentaron tamaños de un 79 % pequeño, 18 % mediano y 3 % grande; asimismo, para la variedad Amarilla Tumbay el 90 % fue pequeño, 9 % mediano y 4 % grande. Para el caso del TT provenientes de esquejes, la variedad Peruanita produjo un 82 % pequeño, 14 % mediano y 1 % grande; y la variedad Amarilla Tumbay presentó el 85 % pequeño, 14 % mediano y 1 % grande (Figura 4). Estos resultados son favorables para un programa de producción de semillas, donde lo óptimo es la producción de tubérculos pequeños y medianos en beneficio del productor (manejo y transporte).

possibly due to the behavior of the tissues in the temporary immersion system (SIT), where they are subjected to constant gas exchange and permanent contact with the liquid nutrient. Another of the positive factors presented by the SIT was the better quality of the root system before transplantation, which allowed the plants to be photosynthetically more adapted and with faster growth. Also, Andrade-Bolaños *et al.* (2017), reported an average yield of 3.75 kg.m² in the study of the varieties Superchola and Diacol Capiro

Conclusion

The BIT technique improved the characteristics of the “Peruanita” and “Amarilla Tumbay” varieties,

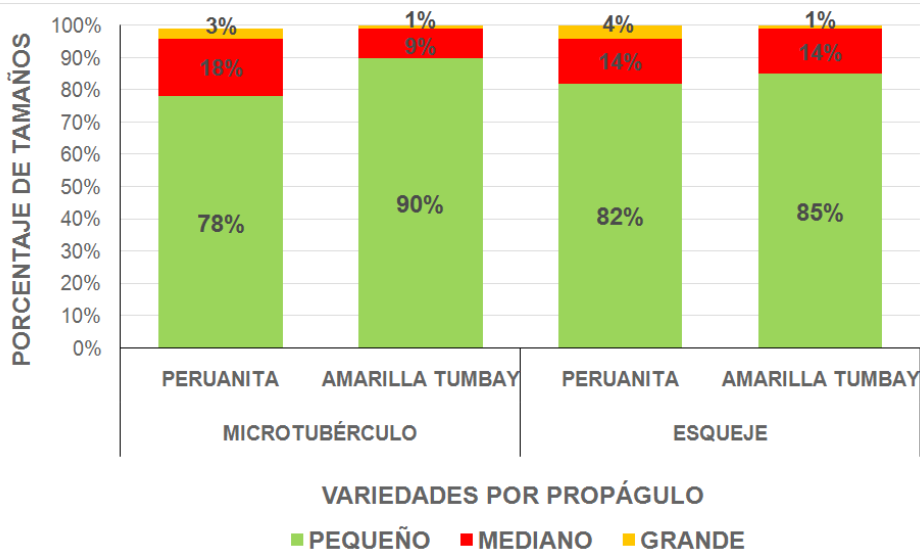


Figura 4. Tamaño de tubérculos con propágulos de Microtubérculo y Esqueje de la variedad “Peruanita” y “Amarilla Tumbay”.

Figure 4. Size of tubers with propagules of Microtubers and Cuttings of the varieties “Peruanita” and “Amarilla Tumbay”.

El color de piel del tubérculo de la variedad “Peruanita” y “Amarilla Tumbay” por cada propágulo se muestra en la figura 5. De ellos, los tubérculos provenientes de microtubérculo, el 97 % presentó un color amarillo y rojo y las provenientes del esqueje fueron un 98 %. Por otro lado, el color en la variedad “Amarilla Tumbay” proveniente de microtubérculo y esqueje presentaron un 100% de color amarillo. Los colores obtenidos para ambas variedades corresponden a las características propias de la variedad (Gómez *et al.*, 2008; INIA, 2009; MINAGRI *et al.*, 2017).

especialmente the survival of the seedlings, the number, diameter and weight of the tubers for the production of basic seed when they are obtained from microtubers with respect to the cuttings. Likewise, the seed tubers obtained from microtubers showed a better yield with an average of 26.89 ± 0.68 kg.14.05 m⁻².

It was shown that biotechnological methods to produce basic seed can be used for native potato varieties; this could allow meeting the demand of farmers, in order to guarantee the sustainable production of this crop. The studies taking into account other parameters on the quality of the basic seed must be developed.



Figura 5. Color de los tubérculos obtenidos en las variedades nativas de papa (a) “Peruanita” y (b) “Amarilla Tumbay”.

Figure 5. Color of the tubers obtained in the native potato varieties (a) “Peruanita” and (b) “Amarilla Tumbay”

Rendimiento

Como se observa en el Cuadro 4 el rendimiento en un área determinada de 14,05 m² mostró que el T3 (Amarilla Tumbay x Microtubérculo) y T1 (Peruanita x Microtubérculo), presentan los máximos promedios con 27,24 ± 0,483 y 26,54 ± 0,483 kg respectivamente, con significancia estadística (p< 0,05). Lo que indica un buen rendimiento de los propágulos obtenidos de microtuberculos.

El mayor rendimiento de propágulos provenientes de microtubérculos (Cuadro 5) se debe posiblemente al comportamiento de los tejidos en el sistema de inmersión temporal (SIT) donde se encuentran sometidos a un intercambio gaseoso constante y contacto permanente con el medio nutritivo

Acknowledgments

This work has been carried out jointly with the Laboratory of the *in vitro* culture of the Universidad Agraria La Molina, the Velacar Inversiones S.A.C. and the Faculty of Agronomy of the National University of the Center of Peru. This research was developed within the framework of the Project “Validation of the production of pre-basic seed of native potato varieties (*Solanum tuberosum* L.), obtained in a bioreactor system and direct sowing in the definitive field with the participation of the Pacamarca-Junín community”.

End of English Version

líquido. Otro de los factores positivos que presentó el SIT fue la mejor calidad del sistema radicular antes del trasplante, lo que permitió que las plantas sean fotosintéticamente más adaptadas y con

un crecimiento más rápido. También, Andrade-Bolaños *et al.*, 2017, reportaron un rendimiento promedio de 3,75 kg.m² en el estudio de las variedades Superchola y Diacol Capiro.

Cuadro 4. Análisis del rendimiento (R) para dos variedades de papa nativa (Peruanita y Amarilla Tumbay) para la producción de semilla básica de papa.

Table 4. Yield analysis (R) for two varieties of native potato (Peruanita and Amarilla Tumbay) for the production of basic potato seed

Tratamiento	R (kg.14,05 m ²)	Estimación (t.ha ⁻¹)	Significación
T1	26,54 ±0,483	18,89	a b
T2	19,32 ±0,483	13,75	d
T3	27,24 ±0,483	19,39	a
T4	21,27 ±0,483	15,14	c

A.L.S.(T)_{0,05} = 1,37

A.L.S.(T)_{0,05} = 1.37

Cuadro 5. Comparación del rendimiento para los dos niveles del factor propágulos para semilla básica de papa.

Table 5. Comparison of the yield for the two types of propagules for basic potato seed.

O.M	Nivel	Promedio	Significación
1	b ₁ (Microtubérculo)	26,89	a
2	b ₂ (Esqueje)	20,30	b

A.L.S.(T)_{0,05} = 0,68

A.L.S.(T)_{0,05} = 0.68

Conclusión

Los microtubérculos obtenidos en los BIT influyen positivamente en las características de papa nativas “Peruanita” y “Amarilla Tumbay”, destacando en las variables supervivencia, número de tubérculos, diámetro de tubérculo y peso de tubérculos para la producción de semilla básica con respecto a los de esquejes; así mismo, los tubérculos

semillas obtenidos de microtubérculos presentaron un mejor rendimiento con un promedio de 26,89 ± 0,68 kg.14,05 m².

Se demostró que los métodos biotecnológicos para producir semilla de categoría básica pueden ser utilizados para variedades de papa nativa; lo que podría permitir atender la demanda de los agricultores, a fin de garantizar la producción sustentable de este tubérculo, además continuar

los estudios teniendo en cuenta otros parámetros sobre la calidad de la semilla básica.

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido realizado conjuntamente con el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de la Universidad Agraria la Molina, la empresa privada Velacar Inversiones S.A.C. y la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional del Centro del Perú, dentro del marco del Proyecto “Validación de la producción de semilla pre básica de variedades de papa nativa (*Solanum tuberosum* L.), obtenidas en sistema de biorreactores y la siembra directa en campo definitivo con participación de la comunidad de Pacamarca - Junín”.

Literatura citada

- Andrade, H., F. Mullo y V. Roja. 2017. Sistema de Inmersión Temporal en la propagación de minitubérculos semilla de papa. Rev. Latinoam. papa. 21 (2): 97-105.
- Aguilar, M., C. Cruz, Z. Ortiz y J. Zeledón. 2016. Producción de Microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.), cultivar Burren, en biorreactores económicos de inmersión temporal. La Calera. 16(27): 75 -80.
- Albarrán, J., E. Salazar, I. Trujillo, A. Vegas, A. González, A. Díaz y A. Silva. 2014. Biorreactores de inmersión temporal para la propagación masiva de plantas. INIA Divulga. Revista de difusión de tecnología agrícola, pecuaria, pesquera y acuicola 60.
- Aragón, C., M. Escalona, I. Capote, D. Pina, I. Cejas y J. González. 2004. Evaluación del efecto de las condiciones generadas por Biorreactores de inmersión temporal sobre enzimas y procesos clave del metabolismo del carbono en plantas *in vitro* de plátano cv. CEMSA ¾. Biot. Veg. 4 (3): 147-152.
- Arcos, J. y D. Zúñiga. 2016. Rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas con capacidad para mejorar la productividad en papa. Rev. latinoam. papa. 20 (1): 19-31.
- Cadima, X. y I. López. 2018. Definición de repertorios de cultivares de papa para agricultores altoandinos en un contexto de cambio climático. Rev. latinoam. papa 22(1):38-48.
- Centro Internacional de la Papa (CIP). 2006. Catálogo de variedades de papa nativa de Huancavelica-Perú. Lima, Perú. 208 p.
- Centro Internacional de la Papa (CIP). 2010. Procedimientos para pruebas de evaluación de clones avanzados de papa. Guía para colaboradores internacionales. Lima, Perú. 25 p.
- Cruzat, R. 2009. Resultados y lecciones en sistema de inmersión temporal en especies anuales, frutales y vides. Proyecto de innovación en Regiones Metropolitanas, del Maule, del Biobío, y de los Ríos. Maule., CH. Fundación de innovación agraria. Ministerio de Agricultura de Chile. Chile.30 p.
- Donnelly, D., W. Coleman y S. Coleman. 2003. Potato microtuber production and performance: A review. Am. J. Potato Res. 80 (2): 103-115.
- Egúsquiza, B. 2014. La papa en el Perú. 2da. Edición. Oficina Académica de Extensión y Extensión de la Universidad Agraria La Molina. Lima, Perú. 200 p.
- Fano, H., M. Ordinola y C. Velasco. 2011. Agregando valor a las papas nativas en el Perú: un análisis desde el enfoque de sistemas de innovación. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 97 p.
- García, L., M. Rodríguez, K. Dilhara, I. Méndez, M. La O, M. Pérez, Y. Alvarado, M. De Feria, N. Veitía, O. Hurtado, J. Castillo. 2016. Formación de minitubérculos de cuatro variedades cubanas de *Solanum tuberosum* L. en casa de cultivo. Biotecnología Vegetal 16(4). 203 – 214.





- Gómez, R., W. Rocas, M. Ordinola, K. Manrique, P. Julca y M. Timoteo. 2008. Papa nativa del Perú: Catálogo de variedades y usos gastronómicos. Primera Edición. Ministerio de Agricultura (MINAGRI). Lima, Perú. 115 p.
- Igarza, J., D. Agramonte, Y. Alvarado, M. De Fera y T. Pugh. 2012. Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. Biot. Veg. 12(2): 3-24.
- Igarza, J., M. De Fera, Y. Alvarado-Capó, T. Pugh, M. Pérez y D. Agramonte. 2013. Empleo de microtubérculos de papa cv. Andinita obtenidos en Sistema de Inmersión temporal para producir minitubérculos en casa de cultivo. Biot. Veg. 13(4): 209-217.
- Igarza, J., M. De Fera, Y. Alvarado, T. Pugh, M. Pérez, M. San Román. 2014. Caracterización morfo-agronómica de plantas de papa cv. 'Andinita' a partir de la siembra en campo de microtubérculos obtenidos en sistema de inmersión temporal. Biot. Veg. 14(2): 81- 89.
- Igarza, J., M. De Fera, Y. Alvarado, T. Pugh, J. Jaime, M. Pérez y D. Agramonte. 2015. Efecto del tipo de explante y la frecuencia de inmersión en la producción de microtubérculos de papa cv. Andinita en Sistemas de Inmersión Temporal. Biot. Veg. 15(2): 105-115.
- Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). 2002. Variedades nativas y mejoradas de papa en Puno. Comité de Publicaciones de la Estación Experimental Agraria Illpa. Lima, Perú. 120 p.
- Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). 2009. Caracterización morfológica y agronómica de 61 variedades nativas de papa. Coordinación Nacional de Programa de Investigación en papa. Huancayo, Perú. 343 p.
- Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI), Grupo Yanapai, Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) y Centro Internacional de la Papa (CIP). 2017. Catálogo de variedades de papa nativa del sureste del departamento de Junín, Perú. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 228 p.
- Montgomery, D. 2004. Diseño y Análisis de Experimentos. Segunda Edición. Editorial Limusa, S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores. México, D.F. 692 p.
- Montoya, N., D. Castro y G. Díaz. 2008. Tuberización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.), variedad Diacol Capiro, en biorreactores de inmersión temporal y evaluación de su comportamiento en campo. Ciencia 16(3): 288-295.
- Morillo, A., Y. Morillo y M. Leguizamo. 2019. Caracterización morfológica y molecular de *Oxalis tuberosa* Mol. En el departamento de Boyacá. Rev. Colomb. Biotecnol. 21 (1): 18-28.
- Ochoa, C. 1999. Las papas de Sudamérica. Centro Internacional de la Papa, Lima. 1036 p.
- Reategui, K., A. Nazario, O. Ricardo y E. Aguirre. 2019. Fenología y rendimiento de cuatro variedades de papa en el Altiplano peruano. Sci. Agropecu. 10 (2): 265-274.
- Soto, J., T. Medina, Y. Aquino y R. Estrada. 2014. Diversidad genética de papas nativas (*Solanum* spp.) conservadas en cultivares nativos del Perú. Rev. Perú. biol. 20(3): 215 – 222.
- Tapia M., J. Carlos, O. Mosqueda y M. Escalona. 2017. Obtención de microtubérculos y minitubérculos como semilla pre-básica en tres cultivares peruanos de papa. Biot. Veg. 17 (3): 161-199.

Adubos orgânicos e fertirrigação com esterco aviário fervido para o cultivo de morangueiro

Abonos orgánicos y fertirrigación con estiércol de pollo hervido para el cultivo de fresas

Organic fertilizations and fertigation with chicken boiled manure for organic crop

Fernando Teruhiko Hata^{1*}, Maria Tereza de Paula², Amanda A. Moreira², Mauricio Ursi Ventura¹, Romário Fortunato de Lima¹, Gustavo Adolfo de Freitas Fregonezi³ y André Luiz Martinez de Oliveira².

¹Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Agronomia, Londrina, Brasil. Correo electrónico: (FH) hata.ft@hotmail.com, ; (MV) mventura@uel.br, ; (RL) romariolondrina@gmail.com. ²Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Londrina, Brasil. Correo electrónico: (MP) maria_amore2009@hotmail.com; (AM) aleixomoreira1712@gmail.com, ; (AO) almoliva@uel.br, . ³Centro Universitário Filadélfia, Departamento de Agronomia, Londrina, Brasil. Correo electrónico: gustavofregonezi@yahoo.com.br.

Resumo

Para se alcançar alta rentabilidade em cultivos agrícolas, é necessário que a fertilização do solo seja realizada de forma adequada, o que evita excessos de nutrientes e contribui para o manejo sustentável do solo. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de fertilização orgânica com bokashi, penergetic e doses de esterco fervido na produção e teores de nutrientes de pseudofrutos, índice de clorofila foliar e biomassa microbiana do solo no cultivo de morangueiro. O experimento foi conduzido em casa de vegetação avaliando-se variáveis produtivas (peso individual de pseudofrutos e produção total por planta), nutritivas do pseudofruto (nitrogênio, fósforo e potássio), do solo (carbono da biomassa microbiana) e índice de clorofila nas folhas. Os tratamentos foram morangueiro sem adubação (controle), penergetic (1,5 g.L⁻¹), bokashi (50 g por planta) e doses de esterco fervido via fertirrigação (2,5; 5; 7,5 e 10 %, diluído em água) em delineamento

Recibido el 08-06-2019 • Aceptado el 01-07-2020.

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: hata@uel.br

inteiramente casualizado com cinco repetições. Morangueiros fertilizados com bokashi apresentaram médias significativamente superiores de massa de pseudofrutos, produção total de pseudofrutos, valores de clorofila foliar e de carbono da biomassa microbiana do solo. Doses de 7,5 e 10 % de esterco fervido de aviário proporcionaram produção de pseudofrutos similares ao bokashi e ambos foram superiores ao controle. Maiores teores de nitrogênio, fósforo e potássio foram encontrados com tratamento bokashi e os tratamentos com EF 7,5 e 10 % obtiveram médias superiores para teor de fósforo em pseudofrutos, somente.

Palavras chave: Bokashi, Penegetic, *Fragaria x ananassa*, Carbono da Biomassa Microbiana, Nutrientes no pseudofruto.

Resumen

Para lograr una alta rentabilidad en cultivos agrícolas, es necesario que la fertilización del suelo sea realizada de forma adecuada, lo que evita excesos de nutrientes y contribuye para el manejo sustentable del suelo. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de fertilización orgánica con bokashi, penegetic y dosis de estiércol fervido de pollo en la producción y niveles de nutrientes de pseudofrutos, índice de clorofila en hoja y de carbono de la biomasa microbiana del suelo en cultivo de fresa. El experimento fue conducido en invernadero evaluándose variables productivas (peso de cada pseudofruto y producción total de la planta), nutritivas del pseudofruto (nitrógeno, fósforo y potasio), del suelo (carbono de la biomasa microbiana) y índice de clorofila en hoja. Los tratamientos evaluados fueron: testigo (sin fertilización), penegetic (1,5 g.L⁻¹), bokashi (50 g por planta) y dosis de estiércol hervido de pollo (2,5; 5; 7,5 e 10 %, diluido en agua), en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones. Las plantas de fresas fertilizadas con bokashi presentaron medias significativamente superiores de masa individual media de pseudofrutos, producción total de pseudofrutos, índice de clorofila en hoja y de carbono de la biomasa microbiana del suelo. Dosis de 7,5 y 10 % de estiércol hervido de pollo proporcionaron producción de pseudofrutos similares al bokashi y ambos superiores al testigo. Contenido de nitrógeno, fósforo y potasio en pseudofrutos fueran mayores en plantas tratadas con bokashi. Plantas de fresa fertilizadas con estiércol hervido de pollo en dosis 7,5 y 10 % ha producido pseudofrutos con maiores contenidos de fósforo, solamente.

Palabras clave: Bokashi, Penegetic, *Fragaria x ananassa*, carbono de la biomasa microbiana del suelo, Nutrientes en pseudofrutos.

Abstract

In order to achieve high profit in agricultural crops, it is necessary that fertilization of the soil is carried out properly, avoiding over fertilization, which contributes to the sustainable management of the soil. The objective of this study was to evaluate the effect of organic fertilization with bokashi, penegetic and

boiled chicken manure doses on the production and nutrient content of berries, leaf chlorophyll index and soil microbial biomass in strawberry cultivation. The experiment was conducted in protected cultivation, evaluating productive variables (individual weight of berries and total production per plant), nutrients of the berry (nitrogen, phosphorus and potassium), soil (carbon of microbial biomass) and chlorophyll index in sheets. The treatments were strawberry without fertilization (control), penergetic (1.5 g.L⁻¹), bokashi (50 g per plant) and doses of boiled manure via fertigation (2.5; 5; 7.5 and 10%, diluted in water) in a completely randomized design with five replications. Strawberry plants fertilized with bokashi showed significantly higher means of berry biomass, total berry production per plant, leaf chlorophyll and carbon values of soil microbial biomass. Doses of 7.5 and 10% of boiled poultry manure provided berries production similar to bokashi and both were superior to the control. Higher levels of nitrogen, phosphorus and potassium were found with bokashi treatment and treatments with EF 7.5 and 10% obtained higher averages for phosphorus content in berries, only.

Key words: Bokashi, Penergetic, *Fragaria x ananassa*, Soil microbial biomass carbon, Berry nutrient.

Introdução

A cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) apresenta grande importância socioeconômica em diversos municípios brasileiros, seu cultivo exige cerca de 20 equivalentes-trabalhador por hectare e pode proporcionar até 50 mil reais de receita, por hectare ao ano ao agricultor, por isso, apresenta alto retorno monetário em pequenas áreas (Carvalho *et al.*, 2014). A produção brasileira de morangos é estimada em 165 mil toneladas, em uma área de 4500 hectares, sendo que os principais estados produtores são Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo (Antunes *et al.*, 2020).

Para se alcançar alta rentabilidade em cultivos agrícolas, o manejo da fertilidade do solo deve ser realizada de forma adequada, evitando excessos de nutrientes no solo, ou substrato. De uma forma geral, práticas de adubação orgânica

Introducción

El cultivo de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) tiene una gran importancia socioeconómica en varios municipios brasileños, su cultivo requiere alrededor de 20 equivalentes de trabajador por hectárea y puede proporcionar hasta 50 mil reales de ingresos, por hectárea por año al agricultor, por lo tanto, presenta una alta rentabilidad monetaria en áreas pequeñas (Carvalho *et al.*, 2014). La producción brasileña de fresas se estima en 165 mil toneladas, en un área de 4500 hectáreas, siendo los principales estados productores Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul y São Paulo (Antunes *et al.*, 2020).

Para lograr una alta rentabilidad en los cultivos agrícolas, el manejo de la fertilidad del suelo debe realizarse de manera adecuada, evitando el

promovem diversos benefícios para o solo: aumento da permeabilidade, incremento na abundância e atividade de microrganismos, elevação da capacidade de troca catiônica (CTC) e fornecimento de macro e micronutrientes (Souza e Resende, 2006; Lori *et al.*, 2017).

Diversos estudos com fontes de adubação orgânica demonstram que o seu uso promove incremento na produtividade de diversas culturas. Em estudo realizado no Equador, com uso de húmus de minhoca combinado com aguapé (*Eichhornia crassipes*) (1:1) proporcionou os melhores resultados na produção de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) (Reyes-Pérez *et al.*, 2018). A adubação com doses crescentes de bokashi entre 150 e 600 g.m⁻¹ promoveu aumento na produtividade de beterraba (*Beta vulgaris* L.) (de Lima Silva *et al.*, 2018). A aplicação de 327 mL de biofertilizante bovino por planta por semana em fertirrigação proporcionou maiores produtividades em morangueiro da cultivar Oso Grande (Lima *et al.*, 2018). Composto orgânico a dose de 1,5 kg.planta⁻¹ promoveu incremento em biomassa de pseudofrutos e produção total de pseudofrutos em morangueiro (Hata *et al.*, 2019a).

Existem diversas fontes de fertilizantes orgânicos, no entanto, estudos com o esterco de aves fervido ainda são escassos na literatura. Recente estudo sobre doses de esterco de aves fervido indica que há incremento de biomassa de rúcula (*Eruca sativa* L.) na dose de 10% e incremento em biomassa de bulbo

exceso de nutrientes en el suelo o sustrato. En general, las prácticas de fertilización orgánica promueven varios beneficios para el suelo: mayor permeabilidad, mayor abundancia y actividad de microorganismos, mayor capacidad de intercambio catiónico (CIC) y suministro de macro y micronutrientes (Souza y Resende, 2006; Lori *et al.*, 2017).

Varios estudios con fuentes de fertilización orgánica muestran que su uso promueve un aumento en la productividad de varios cultivos. En un estudio realizado en Ecuador, el uso de humus de lombriz combinado con jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) (1: 1) proporcionó los mejores resultados en la producción de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Reyes-Pérez *et al.*, 2018). La fertilización con dosis crecientes de bokashi entre 150 y 600 g.m⁻¹ promovió un aumento en la productividad de la remolacha (*Beta vulgaris* L.) (de Lima Silva *et al.*, 2018). La aplicación de 327 mL de biofertilizante bovino por planta por semana en fertirrigación proporcionó una mayor productividad en el cultivar de fresa Oso Grande (Lima *et al.*, 2018). El compuesto orgánico a dosis de 1,5 kg.Planta⁻¹ promovió un aumento de la biomasa de pseudo frutas y la producción total de pseudo frutas en fresa (Hata *et al.*, 2019a).

Hay varias fuentes de fertilizantes orgánicos, sin embargo, los estudios con estiércol de aves hervido son aún escasos en la literatura. Un estudio reciente sobre dosis de estiércol de ave hervido indica que hay un aumento en la biomasa de rúcula

de rabanete (*Raphanus sativus* L.) na dose de 7,5% (Hata *et al.*, 2019c). Este adubo, usado como fertirrigação, pode ser uma fonte alternativa de fertilização, de fácil obtenção e preparo. A fervura proporciona maior agilidade na liberação dos nutrientes, além de reduzir a contaminação por microorganismos patogênicos à saúde humana. Em análise realizada no Rio Grande do Sul – Brasil, as seguintes concentrações foram observadas para o esterco fervido de aves: nitrogênio (1,4 g.kg⁻¹), fósforo (0,18 g.kg⁻¹), potássio (2,96 g.kg⁻¹), cálcio (0,06 g.kg⁻¹), magnésio (0,11 g.kg⁻¹), enxofre (0,77 g.kg⁻¹) e zinco (0,01 g.kg⁻¹) (Ilha, 2012).

Com isso, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de fertilização orgânica com bokashi, penergetic e doses de esterco fervido na produção e teores de nutrientes de pseudofrutos, índice de clorofila foliar e biomassa microbiana do solo no cultivo de morangueiro.

Materiais e métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, localizada no campus da Universidade Estadual de Londrina (23°20'28" S, 51°12'34" O; 548 m), durante o ano de 2016. O clima da região é do tipo Cfa (clima temperado úmido, com verão quente), segundo a classificação climática de Köppen (Aparecido *et al.*, 2016).

Foram utilizados vasos de 7 L de capacidade, preenchidos com solo (Latosolo Vermelho, textura argilosa). Os tratamentos foram: doses de fertirrigação com doses de esterco fervido diluído em água (2,5; 5; 7,5 e 10 %); bokashi (50 g.planta⁻¹)

(*Eruca sativa* L.) a la dosis del 10% y un aumento en la biomasa del bulbo de rábano (*Raphanus sativus* L.) a la dosis del 7,5% (Hata *et al.*, 2019c). Este fertilizante, utilizado como fertirrigación, puede ser una fuente alternativa de fertilización, fácil de obtener y preparar. La ebullición proporciona una mayor agilidad en la liberación de nutrientes, además de reducir la contaminación por microorganismos patógenos para la salud humana. En un análisis realizado en Rio Grande do Sul - Brasil, se observaron las siguientes concentraciones para estiércol de aves hervido: nitrógeno (1,4 g.kg⁻¹), fósforo (0,18 g.kg⁻¹), potasio (2,96 g.kg⁻¹), calcio (0,06 g.kg⁻¹), magnesio (0,11 g.kg⁻¹), azufre (0,77 g.kg⁻¹) y zinc (0,01 g.kg⁻¹) (Ilha, 2012).

Con ello, el objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la fertilización orgánica con dosis de bokashi, penergetico y estiércol hervido en la producción y contenido de nutrientes de pseudo frutas, índice de clorofila foliar y biomasa microbiana del suelo en el cultivo de fresa.

Materiales y métodos

El experimento se realizó en un invernadero, ubicado en el campus de la Universidad Estatal de Londrina (23°20'28 " S, 51°12'34 " O; 548 m), durante 2016. El clima de la región es de tipo Cfa (clima templado húmedo, con verano caluroso), según la clasificación climática de Köppen (Aparecido *et al.*, 2016).

Se utilizaron macetas de 7 L llenas de tierra (Latosol Rojo, textura

sobre o substrato; Penergetic (1,5 g.L⁻¹) e controle (somente água).

As mudas de morangueiro, variedade Dover, foram adquiridas em viveiro comercial e transplantadas em vasos, contendo uma planta de morangueiro cada. O transplante ocorreu no dia 31 de maio de 2016.

Os seguintes tratamentos culturais foram realizados em todas as plantas: Aplicação de *Trichoderma harzianum* (1,5 g.L⁻¹) e *Paecilomyces lilacinus* (1,5 g.L⁻¹) no transplante das mudas e outra aplicação com os mesmos produtos uma semana após o transplante. Aplicação semanal de urina de vaca (5 %), 40 mL por planta. No dia 11 de agosto de 2016 foi aplicado óleo de nim (0,3 %), para controle de ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Koch).

Preparo e aplicação dos fertilizantes orgânicos

O preparo do esterco fervido (EF) foi realizado a partir da fervura, por 4 horas, de 30 kg de esterco de galinha poedeira em 200 L de água. Após a fervura, os seguintes nutrientes foram encontrados no esterco fervido puro: N: 3,80 g.kg⁻¹; P: 0,01 g.kg⁻¹; K⁺: 0,002 g.kg⁻¹; Ca⁺²: 0,31 g.kg⁻¹ e Mg⁺²: 0,11 g.kg⁻¹. A partir da solução obtida após a fervura foram preparadas as concentrações para a fertirrigação.

O bokashi foi produzido pelo Eng. Agrônomo Gilberto Shingo, em sua propriedade rural, localizado em Ibiporã - PR e possui as seguintes características químicas= (N: 37,67 g.kg⁻¹; P: 14,36 g.kg⁻¹; K: 21,01 g.kg⁻¹; Ca: 12,00 g.kg⁻¹; Mg: 8,8 g.kg⁻¹).

O produto Penergetic é constituído de argila bentonita submetida a

arcillosa). Los tratamientos fueron: dosis de fertirrigación con dosis de estiércol hervido diluido en agua (2,5; 5; 7,5 y 10%); bokashi (50 g. planta⁻¹) sobre el sustrato; Penergetic (1,5 g.L⁻¹) y control (solo agua).

Las plántulas de fresa, variedad Dover, se compraron en un vivero comercial y se trasplantaron en macetas que contenían una planta de fresa cada una. El trasplante tuvo lugar el 31 de mayo de 2016.

En todas las plantas se realizaron los siguientes tratamientos de cultivo: Aplicación de *Trichoderma harzianum* (1,5 g.L⁻¹) y *Paecilomyces lilacinus* (1,5 g.L⁻¹) en plántulas trasplantadas y otra aplicación con los mismos productos una semana después del trasplante. Aplicación semanal de orina de vaca (5%), 40 mL por planta. El 11 de agosto de 2016, se aplicó aceite de neem (0,3%) para controlar los ácaros rayados (*Tetranychus urticae* Koch).

Preparación y aplicación de fertilizantes orgánicos.

La preparación de estiércol hervido (EF) se realizó hirviendo, durante 4 horas, 30 kg de estiércol de gallina ponedora en 200 L de agua. Después de hervir, se encontraron los siguientes nutrientes en el estiércol hervido puro: N: 3,80 g.kg⁻¹; P: 0,01 g.kg⁻¹; K⁺: 0,002 g.kg⁻¹; Ca + 2: 0,31 g.kg⁻¹ y Mg + 2: 0,11 g.kg⁻¹. Las concentraciones para fertirrigación se prepararon a partir de la solución obtenida después de hervir.

Bokashi fue producido por el Ingeniero Agrónomo Gilberto Shingo, en su propiedad rural, ubicada en Ibiporã - PR y tiene las siguientes

campos elétricos e magnéticos e foi obtido a partir de produto comercial. Uma semana antes do transplante foi aplicado o Penegetic formulação K, sobre o solo e duas semanas após o transplante foi aplicado o Penegetic formulação P, sobre as plantas. Em cada planta foi pulverizado 30 mL de cada formulação, no solo ou sobre a planta.

Para os tratamentos bokashi e Penegetic foram utilizados somente água para a irrigação por gotejo, três vezes ao dia. Para os tratamentos com EF, foram realizadas três irrigações ao dia, duas somente com água e uma com a fertirrigação com as concentrações de esterco fervido.

Variáveis avaliadas

Para a avaliação de número e massa de cada pseudofruto e produção total por planta, foram coletados e quantificados a massa de pseudofrutos comerciais (perfeitos e com defeito leve) (PBMH e PIMO, 2009). Os pseudofrutos não comerciais, com defeitos graves (com deformação grave, dano mecânico, lesão profunda ou com podridão), foram descartados. As colheitas de pseudofrutos em ponto de maturação (3/4 maduro) foram realizadas três vezes por semana.

Para a leitura do índice de medida indireta de clorofila, foi utilizado aparelho Falker ClorofiLOG® 1030. As leituras foram realizadas em plantas com florescimento pleno, 50 dias após o transplante das mudas, tomando folhas jovens, totalmente expandidas, de morangueiro e realizada a leitura com o aparelho.

Para quantificar os teores de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio

características químicas = (N: 37.67 g.kg⁻¹; P: 14.36 g.kg⁻¹; K: 21,01 g.kg⁻¹; Ca: 12,00 g.kg⁻¹; Mg: 8,8 g.kg⁻¹).

El producto Penegetic consiste en arcilla bentonita sometida a campos eléctricos y magnéticos y se obtuvo de un producto comercial. Una semana antes del trasplante se aplicó la formulación Penegetic K al suelo y dos semanas después del trasplante se aplicó la formulación Penegetic P a las plantas. Se pulverizaron 30 ml de cada formulación sobre cada planta, sobre el suelo o sobre la planta.

Para los tratamientos de bokashi y Penegetic, solo se utilizó agua para riego por goteo, tres veces al día. Para los tratamientos de PE se realizaron tres riegos al día, dos con agua solamente y uno con fertirrigación con las concentraciones de estiércol hervido.

Variables evaluadas

Para evaluar el número y masa de cada pseudo fruta y la producción total por planta, se recolectó y cuantificó la masa de pseudo frutas comerciales (perfecta y con un ligero defecto) (PBMH y PIMO, 2009). Se descartaron pseudo frutas no comerciales, con defectos graves (con deformación severa, daño mecánico, daño profundo o con podredumbre). La recolección de pseudo frutas en el punto de maduración (3/4 maduras) se realizó tres veces por semana.

Para leer el índice de medición indirecta de clorofila se utilizó un dispositivo Falker ClorofiLOG® 1030. Las lecturas se tomaron en plantas en plena floración, 50 días después de trasplantar las plántulas, tomando

(K) foram coletados pseudofrutos da segunda florada. Após a coleta, os pseudofrutos foram lavados, embalados em sacos de papel e encaminhado diretamente ao laboratório para análise. Para a determinação dos teores de nutrientes foi realizada a digestão de Kjeldahl, para o nitrogênio e fotometria de chama, para o potássio (AOAC, 1992). Os teores de P foram determinados de acordo com metodologia descrita por Malavolta *et al.* (1997) utilizando um espectrofotômetro de absorção atômica (Modelo GBC, 932 AA, Austrália). Os resultados foram expressos em g.kg^{-1} .

Para análise microbiológica do solo, foi realizada determinação do carbono da biomassa microbiana do solo (BMS-C). Ao final do ciclo produtivo, foram tomadas amostras de solo de cada um dos tratamentos, que foram secas ao ar, peneiradas em malha de 2 mm, e armazenadas à sombra e sob temperatura ambiente. Para as análises microbiológicas, foram tomadas sub amostras de 50 g do solo armazenado, dispostas em placas de Petri esterilizadas e adicionadas de 20 mL de água destilada esterilizada, seguindo uma incubação em câmara climatizada ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 7 dias no escuro, para a reativação dos microrganismos (Gonçalves *et al.*, 2002).

Após o período de incubação, foi determinado o BMS-C pelo método de fumigação-extração (Silva *et al.*, 2007). Amostras de 20 g foram fumigadas com 1 mL de clorofórmio, isento de etanol, adicionado diretamente ao solo e armazenadas por 24 h a 25-28

hojas jóvenes, completamente expandidas, de fresa y se realizó lectura con el dispositivo.

Para cuantificar los niveles de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) se recolectaron pseudo frutas de la segunda floración. Después de la recolección, las pseudo frutas fueron lavadas, empacadas en bolsas de papel y enviadas directamente al laboratorio para su análisis. Para la determinación del contenido de nutrientes se realizó digestión Kjeldahl para nitrógeno y fotometría de llama para potasio (AOAC, 1992). Los niveles de P se determinaron según la metodología descrita por Malavolta *et al.* (1997) utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica (Modelo GBC, 932 AA, Australia). Los resultados se expresaron en g.kg^{-1} .

Para el análisis microbiológico del suelo, se realizó la determinación de carbono de la biomasa microbiana del suelo (BMS-C). Al final del ciclo produtivo se tomaron muestras de suelo de cada uno de los tratamientos, las cuales se secaron al aire, se tamizaron en una malla de 2 mm y se almacenaron a la sombra y a temperatura ambiente. Para el análisis microbiológico, se tomaron 50 g de sub muestras del suelo almacenado, se colocaron en placas de Petri estériles y se agregaron 20 ml de agua destilada estéril, luego de una incubación en una cámara calentada ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 7 días. en la oscuridad, para la reactivación de microorganismos (Gonçalves *et al.*, 2002).

Después del período de incubación, la BMS-C se determinó mediante el método de fumigación-extracción (Silva

°C, em dessecador na ausência de luz. No dia seguinte, após a remoção do clorofórmio em capela de exaustão, as amostras fumigadas e não fumigadas foram extraídas com sulfato de potássio 0,5 M (1:4) por 30 min a 220 rpm e filtradas. O carbono orgânico dissolvido em todos os filtrados foi determinado por titulação, com sulfato ferroso amoniacal 0,033 M acidificado após a digestão com dicromato de potássio 0,066 M. O BMS-C foi calculado como: $BMS-C: EC/KE$; onde EC é a diferença entre o carbono orgânico extraído de solo fumigado e carbono orgânico extraído de solo não fumigado, $KC: 0,33$, fator de correlação.

Delineamento experimental

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com seis repetições para a leitura do índice de clorofila e cinco repetições para as demais variáveis. Cada planta foi considerada uma repetição. Os valores de médias obtidas foram submetidos à análise de variância e teste Tukey ($p < 0,05$).

Resultados e discussão

Os adubos orgânicos influenciaram as variáveis massa média de pseudofruto (MMP) e produção total (PROD) (Tabela 1) ($p < 0,05$). Para a variável MMP o tratamento bokashi proporcionou maior massa, comparado ao controle. Já para a produção total, os tratamentos bokashi, EF 7,5 e 10 % proporcionaram aumento na produção, comparado ao controle. As duas maiores doses de esterco fervido se equivaleram ao tratamento bokashi, um fertilizante orgânico já

et al., 2007). Se fumigaron muestras de 20 g con 1 mL de cloroformo libre de etanol, se agregaron directamente al suelo y se almacenaron por 24 ha 25-28 ° C, en un desecador en ausencia de luz. Al día siguiente, después de retirar el cloroformo en una campana extractora, las muestras fumigadas y no fumigadas se extrajeron con sulfato de potasio 0,5 M (1: 4) durante 30 min a 220 rpm y se filtraron. El carbono orgánico disuelto en todos los filtrados se determinó mediante valoración con sulfato ferroso amoniacal 0,033 M acidificado después de la digestión con dicromato de potasio 0,066 M. Se calculó la BMS-C como: $BMS-C: EC / KE$; donde EC es la diferencia entre el carbono orgánico extraído del suelo fumigado y el carbono orgánico extraído del suelo no fumigado, $KC: 0,33$, factor de correlación.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con seis repeticiones para leer el índice de clorofila y cinco repeticiones para las demás variables. Cada planta se consideró una repetición. Los valores medios obtenidos se sometieron a análisis de varianza y prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Resultados y discusión

Los fertilizantes orgánicos influyeron en las variables masa promedio de pseudo frutas (MMP) y producción total (PROD) (Tabla 1) ($p < 0.05$). Para la variable MMP, el tratamiento con bokashi proporcionó mayor masa en comparación con el control. Para la producción total, los tratamientos de bokashi, EF 7,5

comercialmente bem estabelecido. A maior vantagem do uso de EF está no seu preparo, que demanda pouco mais de quatro horas. Portanto, é um fertilizante de baixo custo e fácil preparo, comparado ao bokashi e ao biofertilizante supermagro, por exemplo.

y 10% proporcionaron un aumento en la producción, en comparación con el control. Las dos dosis más altas de estiércol hervido eran equivalentes al tratamiento con bokashi, un fertilizante orgánico ya comercialmente bien establecido. La mayor ventaja de usar EF está

Tabela 1. Atributos agrônômicos de produção de morangueiro submetido a doses de esterco aviário fervido, Penergetic ou bokashi. Londrina, Paraná, Brasil.

Tabla 1. Atributos agronómicos de la producción de fresa sometida a dosis de estiércol hervido, Penergetic o bokashi. Londrina, Paraná, Brasil.

Tratamentos	MMP	NP	PROD
Controle	8,29 ± 1,02 b	22,67 ± 5,69 a	184,31 ± 24,33 b
EF 2,5 %	9,14 ± 0,99 ab	20,33 ± 0,58 a	185,57 ± 16,60 b
EF 5,0 %	10,07 ± 1,25 ab	25,00 ± 2,00 a	252,60 ± 44,03 ab
EF 7,5 %	10,07 ± 1,02 ab	27,00 ± 4,24 a	268,93 ± 23,32 a
EF 10,0 %	10,58 ± 0,55 ab	25,25 ± 3,59 a	266,21 ± 30,86 a
Penergetic	10,76 ± 1,08 ab	20,75 ± 3,10 a	221,12 ± 17,70 ab
Bokashi	10,92 ± 1,81 a	23,67 ± 5,51 a	252,70 ± 25,27 a
C.V.	11,11	19,34	11,43
F	2,30	1,25	6,02

MMF: Massa média de pseudofruto; NP: Número de pseudofrutos e PROD: Produção total por planta. EF: Esterco aviário fervido. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. C.V.: Coeficiente de variação. F: F-ratio.

MMF: Masa media de pseudofrutas; NP: Número de pseudofrutas y PROD: Producción total por planta. EF: Estiércol de aves hervido. Las medias seguidas de la misma letra no difieren según la prueba de Tukey al 5% de probabilidad. C.V.: Coeficiente de variación. F: relación F.

As produtividades encontradas no presente estudo variaram entre 184,31 (controle) e 268,93 g (EF 10 %) por planta. Estes valores são similares aos encontrados em produção de morango (*Fragaria x ananassa* Duch) em sistema orgânico, variedades Albion (217 g por planta), Aromas

en su preparación, que toma algo más de cuatro horas. Por lo tanto, es un fertilizante de bajo costo y fácil de preparar, en comparación con el bokashi y el biofertilizante superfino, por ejemplo.

La productividad encontrada en el presente estudio varió entre 184,31

(227 g.planta⁻¹) e San Andreas (199 g.planta⁻¹), adubados com cerca de 1,7 kg de esterco bovino por planta (Tonin *et al.*, 2017). Neste estudo, os valores para número de pseudofrutos por planta variaram entre 14 e 19, para Albion e Aromas, respectivamente. Em experimento realizado em condições parecidas, com morangueiro cultivados em cultivo protegido, com vasos de 7 litros de capacidade, a produção por planta variou entre 211 e 245 g.planta (Hata *et al.*, 2019b), valores similares aos encontrados no presente estudo.

Não foram encontrados estudos sobre o uso de bokashi ou doses de esterco fervido de aves em morangueiros. O uso de bokashi em outras plantas tem se demonstrado eficaz no aumento da produtividade ou melhoria da qualidade destes cultivos. O diâmetro e produtividade de cebola (*Allium cepa* L.) foram aumentados com uso de bokashi, além disso, teor de capsaicina e sólidos solúveis de pimenta (*Capsicum annuum* L.) também apresentaram significativo incremento, em comparação a testemunha sem adubação (Álvarez-Solíz *et al.*, 2016). Para o cultivo de brócolis (*Brassica oleraceae* L. var. *italica*), houve resposta linear ao incremento de doses de bokashi (0 a 500 g por planta) (Ferreira *et al.*, 2013).

O tratamento bokashi proporcionou maiores valores de macronutrientes em pseudofrutos de morangueiro (Tabela 2) ($p < 0,05$). Para o nutriente nitrogênio, o bokashi apresentou maiores valores de média (19,23 g.kg⁻¹), comparado aos demais tratamentos,

(testigo) y 268,93 g (FE 10%) por planta. Estos valores son similares a los encontrados en la producción de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) en sistema orgánico, variedades Albion (217 g.planta⁻¹), Aromas (227 g.planta⁻¹) y San Andreas (199 g.planta⁻¹), fertilizado con alrededor de 1,7 kg de estiércol bovino por planta (Tonin *et al.*, 2017). En este estudio, los valores del número de pseudo frutas por planta variaron entre 14 y 19, para Albion y Aromas, respectivamente. En un experimento realizado en condiciones similares, con fresas cultivadas en cultivo protegido, con macetas de 7 Litros de capacidad, la producción por planta varió entre 211 y 245 g.planta (Hata *et al.*, 2019b), valores similares a los encontrados en el presente estudio.

No se encontraron estudios sobre el uso de bokashi o dosis de estiércol de ave hervido en fresas. Se ha demostrado que el uso de bokashi en otras plantas es eficaz para aumentar la productividad o mejorar la calidad de estos cultivos. El diámetro y la productividad de la cebolla (*Allium cepa* L.) se incrementaron con el uso de bokashi, además, el contenido de capsaicina y los sólidos solubles de pimiento (*Capsicum annuum* L.) también mostraron un aumento significativo, en comparación con el control sin fertilización (Álvarez-Solíz *et al.*, 2016). Para el cultivo de brócoli (*Brassica oleraceae* L. var. *italica*), hubo una respuesta lineal al aumento de dosis de bokashi (0 a 500 g por planta) (Ferreira *et al.*, 2013).

El tratamiento con bokashi proporcionó valores más altos de

que não diferiram entre si. Para o nutriente fósforo, o bokashi ($0,160 \text{ g.kg}^{-1}$), EF 7,5 ($0,118 \text{ g.kg}^{-1}$) e 10 % ($0,116 \text{ g.kg}^{-1}$) apresentaram maiores valores, comparados ao controle ($0,095 \text{ g.kg}^{-1}$). Para o nutriente potássio, o maior valor de média foi encontrado para o bokashi ($4,86 \text{ g.kg}^{-1}$), comparado ao tratamento EF 7,5 % ($3,82 \text{ g.kg}^{-1}$). Os teores de fósforo e potássio no pseudofruto obtidos no presente estudo foram abaixo dos encontrados para as variedades de morangueiro Albion, Monterey e San Andreas (Domingues *et al.*, 2018). Os valores daquele estudo variaram entre $3,20$ e $3,94 \text{ g.kg}^{-1}$, para a variedade de morangueiro Monterey, cultivados em sistema orgânico e convencional, respectivamente. Para o potássio, os valores variaram entre $14,30$ a $20,23 \text{ g.kg}^{-1}$ de K, para as variedades de morangueiro Monterey e San Andreas, cultivados em sistema orgânico. Teores médios entre $7,6$ e $8,7 \text{ g.kg}^{-1}$ foram observados para as variedades de morangueiro Toyorrinho e Aromas (Rocha *et al.*, 2008).

O tratamento bokashi proporcionou maior teor de índice de clorofila Falker ($48,15$) ($p < 0,05$) comparado ao controle ($39,50$) ($p < 0,05$), enquanto que o Penergetic apresentou valor intermediário ($44,41$) ($p > 0,05$), não diferindo com os outros tratamentos (Figura 1). Em estudo com doses de fertilizantes, não foi verificada diferença significativa nas leituras de índice de clorofila, mas a cultivar de morangueiro Camino Real apresentou valores maiores que a Camarosa (Vignolo *et al.*, 2011).

macronutrientes em pseudo frutas de fresa (Cuadro 2) ($p < 0,05$). Para el nutriente nitrógeno, el bokashi mostró valores medios más altos ($19,23 \text{ g.kg}^{-1}$), en comparación con los otros tratamientos, que no difirieron entre ellos. Para el nutriente fósforo, bokashi (0.160 g.kg^{-1}), EF 7.5 (0.118 g.kg^{-1}) y 10% (0.116 g.kg^{-1}) mostraron valores más altos, en comparación con el control (0.095 g.kg^{-1}). Para el nutriente de potasio, el valor medio más alto se encontró para bokashi (4.86 g.kg^{-1}), en comparación con el tratamiento con EF 7.5% (3.82 g.kg^{-1}). Los niveles de fósforo y potasio en la pseudo fruta obtenidos en el presente estudio estuvieron por debajo de los encontrados para las variedades de fresa Albion, Monterey y San Andreas (Domingues *et al.*, 2018). Los valores de ese estudio variaron entre $3,20$ y $3,94 \text{ g.kg}^{-1}$, para la variedad de fresa Monterey, cultivada en sistemas orgánicos y convencional respectivamente. Para el potasio, los valores variaron de 14.30 a 20.23 g.kg^{-1} de K, para las variedades de fresa Monterey y San Andreas, cultivadas en un sistema orgánico. Se observaron niveles promedio entre 7.6 y 8.7 g.kg^{-1} para las variedades de fresa Toyorrinho y Aromas (Rocha *et al.*, 2008).

El tratamiento con bokashi proporcionó un índice de clorofila de Falker más alto ($48,15$) ($p < 0,05$) en comparación con el control ($39,50$) ($p < 0,05$), mientras que el Penergetic mostró un valor intermedio ($44,41$) ($p > 0.05$), no difiriendo con los otros tratamientos (Figura 1). En un estudio con dosis de fertilizante, no se encontró diferencia significativa en las lecturas

Tabela 2. Conteúdo de macronutrientes (g.kg⁻¹) em pseudofrutos de morangueiro submetido a doses de esterco aviário fervido, Penergetic ou bokashi. Londrina, Paraná, Brasil.**Tabla 2. Contenido de macronutrientes (g.kg⁻¹) en pseudofrutas de fresa sometidas a dosis de estiércol hervido, Penergetic o bokashi. Londrina, Paraná, Brasil.**

Tratamentos	N	P	K
Controle	8,03 ± 0,09 b	0,095 ± 0,001 cd	4,38 ± 0,18 ab
EF 2,5 %	7,78 ± 0,25 b	0,090 ± 0,002 d	4,09 ± 0,13 ab
EF 5,0 %	8,88 ± 0,11 b	0,106 ± 0,004 bc	4,18 ± 0,08 ab
EF 7,5 %	9,73 ± 0,38 b	0,118 ± 0,003 b	3,82 ± 0,40 b
EF 10,0 %	8,18 ± 1,01 b	0,116 ± 0,001 b	4,18 ± 0,35 ab
Penergetic	9,03 ± 1,51 b	0,099 ± 0,003 cd	3,85 ± 0,45 ab
Bokashi	19,23 ± 1,03 a	0,160 ± 0,006 a	4,86 ± 0,13 a
C.V.	8,02	3,08	6,85
F	50,29	94,07	4,37

N: Nitrogênio, P: Fósforo, K: Potássio. EF: Esterco aviário fervido. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. C.V.: Coeficiente de variação. F: F-ratio.

N: nitrógeno, P: fósforo, K: potasio. EF: Estiércol de aves hervido. Las medias seguidas de la misma letra no difieren según la prueba de Tukey al 5% de probabilidad. C.V.: Coeficiente de variación. F: relación F.

Para o teor de carbono microbiano do solo, o bokashi apresentou maiores valores (986,36 mg C.kg⁻¹ solo) (p<0,05) comparado aos demais tratamentos. O controle apresentou valores (854,55 mg C.kg⁻¹ solo) abaixo do bokashi (p<0,05), mas maiores que o Penergetic (713,64 mg C.kg⁻¹ solo) (p<0,05). Similarmente, estudo realizado com bokashi preparado com microorganismos retirados de mata, foi verificado que este tratamento proporcionou maiores valores de biomassa microbiana (1239 mg C.kg⁻¹ solo), comparado ao controle (sem adubação com bokashi) (821 mg C.kg⁻¹ solo) (Scotton *et al.*, 2017). O

del índice de clorofila, pero el cultivar de fresa Camino Real mostró valores más altos que Camarosa (Vignolo *et al.*, 2011).

Para el contenido de carbono microbiano del suelo, el bokashi mostró valores más altos (986,36 mg C.kg⁻¹ suelo) (p <0,05) en comparación con los otros tratamientos. El control mostró valores (854.55 mg C.kg⁻¹ suelo) por debajo del bokashi (p <0.05), pero mayores que el Penergetic (713.64 mg C.kg⁻¹ suelo) (p <0.05). De igual forma, en un estudio realizado con bokashi preparado con microorganismos extraídos del bosque, se encontró que este tratamiento proporcionó mayores

uso do EM Bokashi como fertilizante em amendoim (*Arachis hypogaea* L.), comparado à adubação química, promoveu maior número e massa de nódulos, além de maior taxa fotossintética (Pei-Sheng e Hui-Lian, 2002).

valores de biomassa microbiana (1239 mg C.kg⁻¹ suelo), en comparación con el testigo (sin fertilización con bokashi) (821 mg C.kg⁻¹ suelo). (Scotton *et al.*, 2017). El uso de EM Bokashi como fertilizante en maní (*Arachis hypogaea* L.), en comparación con la fertilización

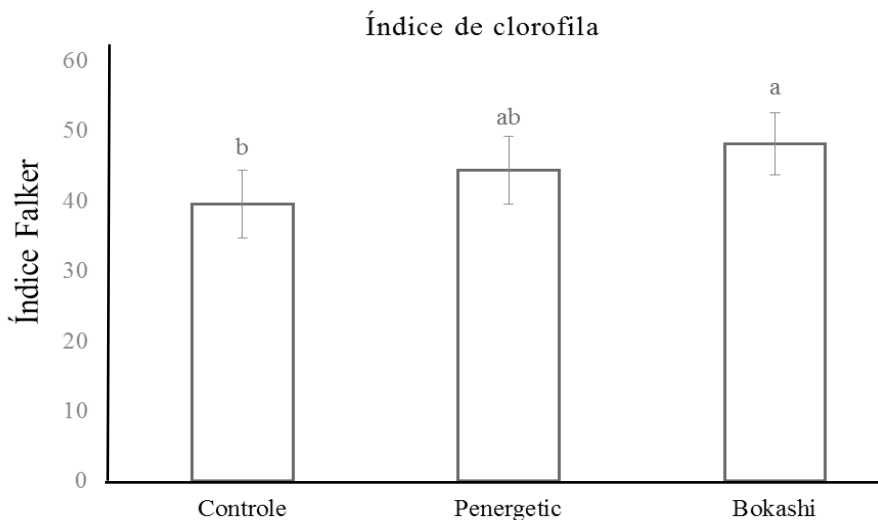


Figura 1. Leituras indiretas de clorofila, em índice Falker, em folhas de morangueiro submetido a Penergetic, bokashi ou controle (sem adubação). Londrina, Paraná, Brasil. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 1. Lecturas indirectas de clorofila, en índice de Falker, en hojas de fresa sometidas a Penergetic, bokashi o control (sin fertilización). Londrina, Paraná, Brasil. Las barras seguidas de la misma letra no diferenc según la prueba de Tukey al 5% de probabilidad.

O Bokashi é um fertilizante rico em matéria orgânica e microrganismos (Quiroz e Céspedes, 2019), o que, provavelmente, pode ter contribuído para a maior média de carbono da massa microbiana. A composição de microrganismos no Bokashi depende da sua formulação e fonte inicial de inóculo, que pode conter farelo de arroz (*Oryza sativa* L.), trigo (*Triticum*

química, promovió un mayor número y masa de nódulos, además de una mayor tasa fotosintética (Pei-Sheng y Hui-Lian, 2002).

El bokashi es un fertilizante rico en materia orgánica y microorganismos (Quiroz y Céspedes, 2019), lo que probablemente contribuyó al mayor promedio de carbono de la masa microbiana. La composición de los

aestivum L.), entre outros produtos e como fonte inicial EM (microrganismos eficientes), microrganismos isolado de mata nativa, entre outros. A composição microbiológica do EM apresenta leveduras, bactérias laticas e fotossintéticas, que possuem como principais funções a de quebra da lignina e celulose, fixação de nitrogênio e atividade antimicrobiana (Higa, 2001).

microorganismos en Bokashi depende de su formulación y fuente inicial de inóculo, que puede contener salvado de arroz (*Oryza sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), entre otros productos y como fuente EM inicial (microorganismos eficientes), microrganismos aislados de bosque nativo, entre otros. La composición microbiológica de la EM presenta leveduras, bacterias lácticas y

BMS-C

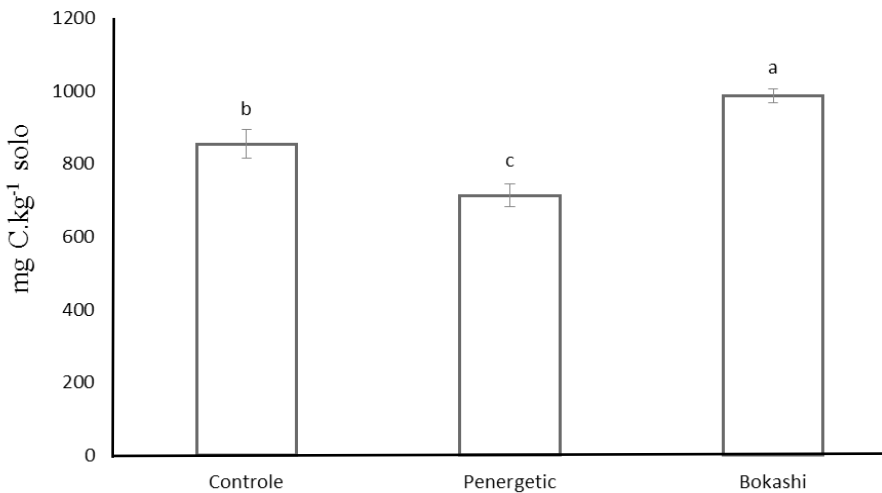


Figura 2. Carbono da biomassa microbiana (BMS-C) em solos cultivados com morangueiro, submetido a Penergetic, bokashi ou controle (sem adubação). Londrina, Paraná, Brasil. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 2. Carbono de biomassa microbiana (BMS-C) en suelos cultivados con fresa, sometidos a Penergetic, bokashi o control (sin fertilización). Londrina, Paraná, Brasil. Las barras seguidas de la misma letra no difieren según la prueba de Tukey al 5% de probabilidad.

Em resumo, os tratamentos bokashi e esterco de galinha fervido (EF) nas doses 7,5 e 10 % promoveram maior produtividade de pseudofrutos por planta de morango. Somente o bokashi promoveu maior massa média de pseudofrutos. Maiores teores de nitrogênio, fósforo e potássio foram encontrados com tratamento bokashi e os tratamentos com EF 7,5 e 10 % obtiveram médias maiores para teor de fósforo em pseudofrutos. O tratamento bokashi obteve maiores médias de índice de clorofila e carbono da biomassa microbiana.

Conclusões

As variáveis produtivas e teores de nutrientes no pseudofruto de morangueiro foram influenciadas pelo bokashi e esterco fervido nas doses de 7,5 e 10 %. O bokashi proporcionou incremento no índice de clorofila foliar e biomassa microbiana do solo no cultivo de morangueiro

Fim da versão em português

fotosintéticas, cuyas principales funciones son la descomposición de la lignina y celulosa, la fijación de nitrógeno y la actividad antimicrobiana (Higa, 2001).

En resumen, los tratamientos de bokashi y estiércol de pollo hervido (EF) en dosis de 7.5 y 10% promovieron una mayor productividad de pseudo frutas por planta de fresa. Solo el bokashi promovió una masa promedio más alta de pseudo frutas. Se encontraron niveles más altos de nitrógeno, fósforo y potasio con el tratamiento con bokashi y los tratamientos con EF 7,5

y 10% obtuvieron promedios más altos para el contenido de fósforo en pseudo frutas. El tratamiento con bokashi obtuvo mayores promedios de clorofila e índice de carbono de la biomasa microbiana.

Conclusiones

Las variables productivas y el contenido de nutrientes en pseudo frutas de fresa fueron influenciadas por el bokashi y el estiércol hervido en dosis de 7,5 y 10%. Bokashi proporcionó un aumento en el índice de clorofila foliar y biomasa microbiana del suelo en el cultivo de fresas

Literatura citada

- Álvarez-Solíz, J.D., J.A. Mendoza-Núñez, N.S. León-Martínez, J. Castellanos-Albores e F.A. Gutiérrez-Miceli. 2016. Effect of bokashi and vermicompost leachate on yield and quality of pepper (*Capsicum annuum*) and onion (*Allium cepa*) under monoculture and intercropping cultures. *Cienc. Investig. Agrar.* 43(2): 243-252.
- Antunes, L.E.C., S. Bonow e C. Reisser Junior. 2020. Morango: crescimento constante em área e produção. In: Anuário HF 2020. Revista Campo & Negócios 88-92. Disponible en: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1122535/1/Anuario-HF-2020-LEC-Antunes.pdf>
- Aparecido, L.E.O., G.S. Rolim, J. Richetti, P.S. de Souza e J.A. Johann. 2016. Köppen, Thornthwaite and Camargo climate classifications for climatic zoning in the State of Paraná, Brazil. *Cienc. Agrotec.* 40(4): 405-417
- Association of Analytical Chemists International - AOAC. 1992. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International. 14 ed. Washington.

- Carvalho, S.P., M.A.C. Zawadneck, P.F.S. Andrade e J.C. Zandoná. 2014. O cultivo do morangueiro no Brasil. In: Como produzir morangos. Zawadneck M.A.C., J.M. Schuber e A.F. Mógor (orgs) Editora UFPR, Curitiba - Paraná - Brazil. p.15-31.
- de Lima Silva, P.N., N.D.B.L. Lanna e A.I.I. Cardoso. 2018. Doses de bokashi em cobertura na produção de beterraba. Rev. Agric. Neotropical. 5(1): 28-34.
- Domingues, A.R., T.C.M. Vidal, F.T. Hata, J.B. da Silva, M.U. Ventura e L.S.A. Gonçalves. 2018. Postharvest quality, antioxidant activity and acceptability of strawberry fruits grown in conventional and organic systems. Braz. J. Food Technol. 21: 2017154.
- Ferreira, S., R.J. Souza e L.A.A. Gomes. 2013. Produtividade de brócolis de verão com diferentes doses de bokashi. Rev. Agrogeoambiental, 5(2): 31-38.
- Gonçalves, A.S., M.T. Monteiro, J.G.M. Guerra e H. De-Polli. 2002. Biomassa microbiana em amostras de solos secadas ao ar e reumedecidas. Pesqui. Agropecu. Bras. 37(5): 651-658.
- Hata, F.T., M.U. Ventura, M.S.D.J. de Souza, N.V. de Sousa, B.G. Oliveira e J.B. da Silva. 2019a. Mineral and organic fertilization affects *Tetranychus urticae*, pseudofruit production and leaf nutrient content in strawberry. Phytoparasitica. 47: 513-521.
- Hata, F.T., M.U. Ventura, M.T. de Paula, G.D. Shimizu, J.C.B. de Paula, D.A.O. Kussaba, N.V. de Sousa. 2019b. Intercropping garlic in strawberry fields improves land equivalent ratio and gross income. Cienc. Rural. 49(12): e20190338.
- Hata, F.T., M.U. Ventura, V. Sousa e G.A.F. Fregonezi. 2019c. Low-cost organic fertilizations and bioactivator for arugula-radish intercropping. Emir. J. Food Agric. 31(10): 773-778.
- Higa, T. 2001. The Technology of Effective Microorganisms: Its role in Kyusei Nature Farming. Sixth International Conference on Kyusei Nature Farming, Ed. by Y. D. A. Senanayake, Sangakkara, U.R., Pretoria, South Africa, 40p..
- Ilha, L.L.H. 2012. Húmus líquido: a utilização de esterco fervido na adubação de hortaliças. II Reunião Sul-Brasileira Sobre Agricultura Sustentável. IV Encontro Caxiense para Desenvolvimento da Agricultura Orgânica Sustentável. Caxias do Sul.
- Lima, F.A., T.V. de Araújo Viana, G.G. de Sousa, L.F.M. Correia e B.M. de Azevedo. 2018. Yield of strawberry crops under different irrigation levels and biofertilizer doses. Rev. Cienc. Agron. 49(3): 381-388.
- Lori, M., S. Symnaczik, P. Mäder, G. de Deyn e A. Gattinger. 2017. Organic farming enhances soil microbial abundance and activity—A meta-analysis and meta-regression. PLoS One. 12(7): 180-442.
- Malavolta, E., G.C. Vitti, S.A. Oliveira. 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas. 2. ed. Piracicaba: Potafós. 3219 p.
- PBMH e PIMO - Programa Brasileiro para Modernização da Horticultura e Produção Integrada de Morango. 2009. Normas de Classificação de Morango (Documentos, 33). São Paulo: CEAGESP. 2 p.
- Pei-Sheng, Y. e X. Hui-Lian. 2002. Influence of EM Bokashi on nodulation, physiological characters and yield of peanut in nature farming fields. J. Sust. Agr. 19(4): 105-112.
- Quiroz, M. e C. Céspedes. 2019. Bokashi as an amendment and source of nitrogen in sustainable agricultural systems: A review. J. Plant Nutr. Soil Sci. 19(1): 237-248.
- Rocha, D.A., C.M.P. Abreu, A.D. Corrêa, C.D. Santos e E.W.N. Fonseca. 2008. Análise comparativa de nutrientes funcionais em morangos de diferentes cultivares da região de Lavras-MG. Rev. Bras. Frutic. 30: 1124-1128.
- Reyes-Pérez, J.J., R.A.L. Murillo, M.D.R.R. Bermeo, V.F.V. Morán, D.Z. Burgos e J.A.T. Rodríguez. 2018. Efecto de abonos orgánicos sobre la respuesta






- productiva en el tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Rev. Fac. Agron. (LUZ). 35(1): 26-39.
- Scotton, J. C., J. Silva Pereira, A.A.B. Campos, D.F.P. Pinto, W.L.F. Costa e S.K. Homma. 2017. Different sources of inoculum to the bokashi provides distinct effects on the soil quality. Braz. J. Sust. Agr. 7(3): 32-38.
- Silva E.E., P.H.S. Azevedo e H. de-Polli. 2007. Determinação do Carbono da Biomassa Microbiana do Solo (BMS-C), Comunicado Técnico 98, EMBRAPA Agrobiologia, p.6.
- Souza, J.L. e P. Resende. 2006. Manual de Horticultura Orgânica. 2ªed. Viçosa-MG: Aprenda Fácil. p.843.
- Tonin, J., J.T.M. Machado, J.A. Benati, B. Rohrig, L. Sobucki, T. Chassot e E.P. Schneider. 2017. Yield and quality of fruits of strawberry cultivars in an organic production system. Científica. 45(3): 271-277.
- Vignolo, G.K., V.F. Araújo, R.J. Kunde, C.A.P. Silveira e L.E.C. Antunes. 2011. Produção de morangos a partir de fertilizantes alternativos em pré-plantio. Cienc. Rural. 41(10): 1755-1761.

Characterization of CRISPR genetic sequences in microorganisms associated with infections in shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Caracterización de secuencias genéticas CRISPR en microorganismos asociados a infecciones en camarón (*Litopenaeus vannamei*)

Caracterização de sequências genéticas CRISPR em microrganismos associados a infecções em camarões (*Litopenaeus vannamei*)

Ángel Parra¹, Carla Lossada⁴, Aleivi Pérez³, Johnny Navarrete⁵ and Lenin González^{1,2*}

Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias. La Universidad del Zulia. ¹Laboratorio de Genética y Biología Molecular. Email: (AP) angelparra115@gmail.com, ; Email: (LG) lgonzalezpaz@gmail.com, . ²Laboratorio de Citogenética. ³Laboratorio de Microbiología General. Email: aleiviciencias@gmail.com, . ⁴Laboratorio de Caracterización Molecular y Biomolecular – Centro de Investigación y Tecnología de los Materiales – Instituto Venezolano de Investigación Científica - Zulia. Sección 526. Maracaibo, Venezuela. Email: lossadacarla@gmail.com, . ⁵Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Sitio El Limón, Campus Politécnico Calceta, Manabí, Ecuador. Email: jnava_57@hotmail.com, .

Abstract

In shrimp farming, the family of proteobacteria Vibrionaceae, especially the species of the genus *Vibrio*, represent one of the main responsible for infections in shrimp production (*Litopenaeus vannamei*), generating great losses to this industry. Phagotherapy emerges as a novel alternative for the control of said infections in substitution to the use of antibiotics, thanks to the specific inhibitory activity of these viruses. However, it is necessary to take into account the presence in prokaryotes of genetic sequences called clusters of regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) that act as an immune system against invasion of external mobile genetic elements such

Recibido el 23-08-2019 • Aceptado el 26-10-2020.

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: lgonzalezpaz@gmail.com

as phage or plasmids. Due to its characteristics, the CRISPR/Cas system is used as a tool for gene editing. This study presents the comparative analysis of 7 CRISPR loci found in 5 sequences of complete genomes, available in the database of NCBI/GenBank, to determine the potential use of the phage strategy in shrimp farming. The CRISPR systems corresponded to types I-E, I-F and III-D. 53 % of the spacers (75/142) presented homology with plasmids, while the remaining 47 % (67/142) showed homology with bacteriophages, mostly non-typical *Vibrio* infective viruses. The use of phage therapy is proposed as a treatment for infections caused by members of the family Vibrionaceae in shrimp cultures, due to the low occurrence of CRISPR systems in the species studied and the low immunity to their phages, thus ensuring greater sensitivity.

Keywords: CRISPR-Cas systems, *Vibrio*, phagotherapy, bioinformatic analysis.

Resumen

En el cultivo del camarón, la familia de las proteobacterias Vibrionaceae, especialmente las especies del género *Vibrio*, representan uno de los principales responsables de las infecciones en la producción de camarones (*Litopenaeus vannamei*), generando grandes pérdidas a esta industria. La fagoterapia surge como una alternativa novedosa para el control de dichas infecciones en sustitución al uso de antibióticos, gracias a la actividad inhibitoria específica de estos virus. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta la presencia en procariotas de secuencias genéticas denominadas repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) que actúan como sistema inmune contra la invasión de elementos genéticos móviles externos como fagos o plásmidos. Dadas sus características, el sistema CRISPR/Cas se emplea como herramienta para la edición de genes. En este estudio se presenta el análisis comparativo de 7 loci CRISPR encontrados en 5 secuencias de genomas completos, disponibles en la base de datos del NCBI/GenBank, para determinar la potencialidad del empleo de la estrategia fágica en camaronicultura. Los sistemas CRISPR correspondieron a los tipos I-E, I-F y III-D. El 53 % de los espaciadores (75/142) presentó homología con plásmidos, mientras que el 47 % restante (67/142) mostró homología con bacteriófagos, en su mayoría virus no típicos infectivos de *Vibrio*. Se propone el uso de la fagoterapia como tratamiento de infecciones causadas por miembros de la familia Vibrionaceae en cultivos de camarón debido a la baja ocurrencia de sistemas CRISPR en las especies estudiadas y la baja inmunidad a sus fagos, asegurando así una mayor sensibilidad.

Palabras clave: sistemas CRISPR-Cas, *Vibrio*, fagoterapia, análisis bioinformático.

Resumo

Na criação de camarões, a família das proteobacteria Vibrionaceae, especialmente as espécies agrupadas no género *Vibrio*, representam uma das principais responsáveis por infecções na produção de camarão (*Litopenaeus vannamei*), gerando grandes prejuízos a esta indústria. A terapia fágica surge como uma nova alternativa para o controle dessas infecções em substituição ao uso de antibióticos, graças à atividade inibitória específica desses vírus. No entanto, é necessário levar em consideração a presença em procariotos de sequências genéticas denominadas repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas (CRISPR) que atuam como um sistema imunológico contra a invasão de elementos genéticos móveis externos, como fagos ou plasmídeos. Pelas suas características, o sistema CRISPR / Cas é utilizado como ferramenta de edição de genes. Este estudo apresenta a análise comparativa de 7 locos CRISPR encontrados em 5 sequências de genomas completos, disponíveis no banco de dados do NCBI/GenBank, para determinar o potencial de utilização da estratégia de fagos na carcinicultura. Os sistemas CRISPR corresponderam aos tipos I-E, I-F e III-D. 53 % dos espaçadores (75/142) mostraram homologia com plasmídeos, enquanto os restantes 47 % (67/142) mostraram homologia com bacteriófagos, principalmente vírus infecciosos *Vibrio* não típicos. A utilização da terapia fágica é proposta como tratamento para infecções causadas por membros da família Vibrionaceae em cultivo de camarão devido à baixa ocorrência de sistemas CRISPR nas espécies estudadas e à baixa imunidade aos seus fagos, garantindo assim maior sensibilidade.

Palavras chave: sistemas CRISPR-Cas, *Vibrio*, fagoterapia, análise bioinformática.

Introduction

In shrimp culture, the family of proteobacteria Vibrionaceae, those of the genus *Vibrio*, represent one of the main responsible for the infections with a high influence on larval production associated with shrimp culture (*Litopenaeus vannamei*). These Gram-negative bacteria are ubiquitous and widely distributed in aquatic environments, from brackish water to deep sea water, in association with marine animals, algae and detritus. *Vibrios* are also present in estuarine and marine

Introducción

En el cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*), la familia de proteobacterias Vibrionaceae, el género *Vibrio*, representa uno de los principales responsables de las infecciones con alta influencia en la producción larvaria asociadas al cultivo de camarón. Estas bacterias Gram-negativas son ubicuas y están ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos, desde agua salobre hasta aguas profundas, en asociación con animales marinos, algas y detritos. Los *Vibrios* también

aquatic ecosystems where shrimp are naturally found and/or cultivated. Bacteria of this genus are considered part of the normal microbiota of shrimp, constituting the highest percentage of all bacteria isolated from the digestive tract, gills, cuticle and occasionally in the hemolymph. However, under conditions of stress or imbalance in the natural bacterial microbiota these bacteria can induce the development of infections in organisms such as vibriosis (or bacterial shrimp septicemia) (Cheng *et al.*, 2008; Aguirre *et al.*, 2010; Yooseph *et al.*, 2010).

Of the genus *Vibrio*, the main virulent strains of shrimp identified in various larval stages are *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* and *V. vulnificus* (Kalatzis *et al.*, 2018), generating high mortalities, economic losses in the production; they also cause public health problems in humans due to the consumption of derived marine products contaminated with these opportunistic pathogens (Cheng *et al.*, 2008; Won and Park, 2008; Aguirre *et al.*, 2010; Alagappan *et al.*, 2010). The prevention and control of diseases in shrimp farming is based primarily on the use of antibiotics (Lomelí and Martínez, 2014), however, the growing emergence of bacterial strains resistant to antibiotics, added to the concern induced by the prospect of not having effective antibiotics in the near future, has prompted the search for new antagonistic alternatives toward those that have not yet developed mechanisms of resistance, with fewer side effects, and with high

están presentes en ecosistemas acuáticos estuarinos y marinos donde los camarones se encuentran y/o cultivan naturalmente. Las bacterias de este género se consideran parte de la microbiota normal del camarón, constituyendo el porcentaje más alto de todas las bacterias aisladas del tracto digestivo, branquias, cutículas y ocasionalmente en la hemolinfa. Sin embargo, en condiciones de estrés o desequilibrio en la microbiota bacteriana natural, estas bacterias pueden inducir el desarrollo de infecciones en organismos como la vibriosis (o septicemia bacteriana del camarón) (Cheng *et al.*, 2008; Aguirre *et al.*, 2010; Yooseph *et al.*, 2010).

Del género *Vibrio*, las principales cepas virulentas de camarón identificadas en varios estadios larvales son *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* y *V. vulnificus* (Kalatzis *et al.*, 2018), generando altas mortalidades, pérdidas económicas en la producción; también causan problemas de salud pública en humanos debido al consumo de productos marinos derivados contaminados con estos patógenos oportunistas (Cheng *et al.*, 2008; Won y Park, 2008; Aguirre *et al.*, 2010; Alagappan *et al.*, 2010). La prevención y control de enfermedades en la camaronicultura se basa principalmente en el uso de antibióticos (Lomelí y Martínez, 2014), sin embargo, la creciente aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, sumado a la preocupación inducida por la perspectiva de no contar con antibióticos efectivos. en un futuro próximo, ha impulsado la

specificity, to avoid the disturbance of the intestinal microbiota of the human being and guarantee a greater effectiveness of the treatments (Rice and Stokes, 2008).

One of the promising strategies on the way to the objective of finding more effective, less toxic and specific antagonists to control microorganisms that cause infections, is represented by the viruses that exclusively infect the bacteria, called bacteriophages, and their enzymatic derivatives (enzymiotics). These are inhibitory agents that have been described as potential antimicrobial agents with therapeutic interest (São, 2018), including their application in shrimp farming (Oliveira *et al.*, 2012; Kalatzis *et al.*, 2018).

Although it is not clear if there is any mechanism of bacterial resistance against enzymiotics (phage lysins), studies on the use of phages as an alternative treatment or biological control show the opposite, and currently a large number of investigations are carried out in group of genomic sequences present in several prokaryotic microorganisms known as “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats” (CRISPR), which have shown a distinctive characteristic of most genomes of bacteria and archaea, that endows resistance against bacteriophages (Horvath and Barrangou, 2010; Kalatzis *et al.*, 2018).

In addition to the fact that research on the presence of CRISPRs has focused mainly on

búsqueda de nuevas alternativas antagónicas hacia aquellas que aún no han desarrollado mecanismos de resistencia, con menores efectos secundarios, y con alta especificidad, para evitar la alteración de la microbiota intestinal del ser humano y garantizar una mayor efectividad de los tratamientos (Rice y Stokes, 2008).

Una de las estrategias prometedoras en el camino hacia el objetivo de encontrar antagonistas más eficaces, menos tóxicos y específicos para el control de los microorganismos causantes de infecciones, está representada por los virus que infectan exclusivamente a las bacterias, llamados bacteriófagos, y sus derivados enzimáticos (enzimbióticos). Se trata de agentes inhibidores que han sido descritos como potenciales agentes antimicrobianos con interés terapéutico (São, 2018), incluida su aplicación en el cultivo de camarón (Oliveira *et al.*, 2012; Kalatzis *et al.*, 2018).

Aunque no está claro si existe algún mecanismo de resistencia bacteriana frente a enzibióticos (fago lisinas), los estudios sobre el uso de fagos como tratamiento alternativo o control biológico muestran lo contrario, y actualmente se realizan un gran número de investigaciones en grupo de secuencias genómicas presentes en varios microorganismos procarióticos conocidos como “Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas” (CRISPR), que han mostrado una distintiva característica en la mayoría de los genomas de bacterias y arqueas, que confieren resistencia contra

bacteria of clinical interest, while little is known about the dynamics of CRISPR in organisms of commercial importance (Lyons *et al.*, 2015), the objective of this study, was to perform a comparative analysis of CRISPR Systems in genomes of microorganisms with pathogenic influence on shrimp *Litopenaeus vannamei*.

Materials and methods

Genomic sequences and identification of CRISPR structures

Five species of *Vibrio* were studied: *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* and the species *Photobacterium damsela*, all associated with systemic infections in shrimp, such as vibriosis, of which a total of 1104 genomes were obtained according to the database of the NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Benson *et al.*, 2008). Draft genome sequences were obtained from specific web sites that are compiled in the Entrez Genome project list (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>) or in the Genomes OnLine Database (<http://www.genomesonline.org/>) (Bernal *et al.*, 2001), 69 of the sequences correspond to complete genomic sequences including 14 *V. alginolyticus*, 13 *V. anguillarum*, 21 *V. parahaemolyticus*, 4 *V. harveyi*, 15 *V. vulnificus*, as well as 2 complete chromosomal sequences of *Photobacterium damsela* (Table 1).

bacteriófagos (Horvath y Barrangou, 2010; Kalatzis *et al.*, 2018).

Además de que la investigación sobre la presencia de CRISPRs se ha centrado principalmente en bacterias de interés clínico, mientras que se conoce poco sobre la dinámica de CRISPR en organismos de importancia comercial (Lyons *et al.*, 2015), el objetivo de este estudio, consistió en realizar un análisis comparativo de Sistemas CRISPR en genomas de microorganismos con influencia patógena en camarón *Litopenaeus vannamei*.

Materiales y métodos

Secuencias genómicas e identificación de estructuras CRISPR

Se estudiaron cinco especies de *Vibrio*: *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* y la especie *Photobacterium damsela*, todas asociadas a infecciones sistémicas en camarones, como la vibriosis, de las cuales un total de 1104 genomas se obtuvieron de acuerdo con la base de datos del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Benson *et al.*, 2008). Las secuencias preliminares del genoma se obtuvieron de sitios web específicos que se compilan en la lista de proyectos Entrez Genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>) o en la base de datos Genomes OnLine (<http://www.genomesonline.org/>) (Bernal *et al.*, 2001), 69 de las secuencias corresponden a secuencias genómicas completas, que incluyen 14

Table 1. CRISPR/Cas systems in Vibrionaceae genomes.

Cuadro 1. Sistemas CRISPR / Cas en genomas de Vibrionaceae.

Species	Accession number GenBank	CRISPR loci							CRISPR Type	Cas gene	Ref.
		Length of CRISPR (pb)	Start	End	Spacer number	Length of Spacer (pb)	DR number	Length of DR (pb)			
<i>Vp.</i> FORC_022	CP013248.1 / P013249.1	1707	826587	828284	28	32	29	28	GTTAACCTGCCACACAGCGAGCTTAGAAA	I-F	6
	<i>Vh.</i> ATCC 43516	2287	73577	75664	37	32-33	38	29	GTGTTCCTCGTACCACGGAGATGAACCG	I-E	8
<i>Vh.</i> YJ016	BA000057.2 / A000058.2	661	1694586	1695247	9	33-37	10	35	GTTTCAGACATGCCCGGTTTAGACGG-GATTAAGAC	III-D	7
	<i>Vh.</i> 93U204	3328	511712	515040	55	32	56	28	GTTCACTGCCGTATAGGCGAGCTTAGAAA	I-F	6
<i>Pd.</i> KC-Na-1*	CP021151.1 / P021152.1	256	2123187	2123443	3	43	4	32	GATATTTCTAACTGGGATACTTCCAAT-GTAAA		
		447	246163	246610	7	32	8	28	CITTCACCTGCGAGTAGGCGAGCTTAGAAA	I-F	6
		29	257070	257278	3	31	4	29	CITTCACCTGCGAGTAGGCGAGCTTAGAAAT		

Vp. FORC_022, *Vh.* ATCC 43516, *Vh.* YJ016 y 93U204, *Pd.* KC-Na-1, are the abbreviations of *V. parahaemolyticus* FORC_022, *V. harveyi* ATCC 43516, *V. vulnificus* YJ016 y 93U204, and *P. damselae* KC-Na-1, respectively; *, before classified in *V. damselae*; CRISPR_C, clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; DR, direct repeats; Cas, CRISPR-associated (*cas*) gene cluster.

Vp. FORC_022, *Vh.* ATCC 43516, *Vh.* YJ016 y 93U204, *Pd.* KC-Na-1, son las abreviaturas de *V. parahaemolyticus* FORC_022, *V. harveyi* ATCC 43516, *V. vulnificus* YJ016 y 93U204, y *P. damselae* KC-Na-1, respectivamente; *, antes clasificado en *V. damselae*; CRISPR, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas; DR, repeticiones directas; Cas, grupo de genes asociados a CRISPR (*cas*).

For published genome sequences, CRISPR loci were obtained from the CRISPRdb database (Grissa *et al.*, 2007a). Alternatively, the CRISPR loci in the genomes were identified by CRISPRFinder (Grissa *et al.*, 2007b). For this, two search criteria were followed. One of them was the screening of possible CRISPR locations by detecting maximum repetitions (repetition with the maximum possible extension to the right or left without incurring a mismatch) by using the VMatch package, which is the REPuter update (Kurtz and Schleiermacher, 1999) based on an efficient implementation of improved suffix arrays (Abouelhoda, 2004). The default parameters used were the following: a repetition length of 23 to 55 bp, a gap size between repetitions of 25 to 60 bp, a 20% mismatch of nucleotides between repetitions. The other search criterion was based on the CRISPR function determination, for which filters are added to help validate a CRISPR, such as the search for non-identical spacers with a size that should be from 0,6* to 2,5* the size of the repetition. This filter is configured to eliminate tandem repeats. The comparison of the spacers was made by aligning them (using the default parameters of the Muscle program). The percentage of similarity of the spacers is calculated with the percentage_identity function of the (Bio)perl interface (AlignIO methods, Muscle interface), a parameter set to 60 %.

To discriminate between confirmed CRISPR structures from those questionable, small structures similar to CRISPR, that is, having only two

V. alginolyticus, 13 *V. anguillarum*, 21 *V. parahaemolyticus*, 4 *V. harveyi*, 15 *V. vulnificus*, así como 2 secuencias cromosómicas completas de *Photobacterium damsela* (Cuadro 1).

Las secuencias genómicas públicas de los loci CRISPR se obtuvieron de la base de datos CRISPRdb (Grissa *et al.*, 2007a). Alternativamente, los loci CRISPR en los genomas fueron identificados por CRISPRFinder (Grissa *et al.*, 2007b). Para ello se siguieron dos criterios de búsqueda. Uno de ellos fue el cribado de posibles ubicaciones de CRISPR mediante la detección de repeticiones máximas (repetición con la máxima extensión posible a la derecha o izquierda sin incurrir en un desajuste) mediante el uso del paquete VMatch, que es la actualización de REPuter (Kurtz y Schleiermacher, 1999) basada en una implementación eficiente de arreglos de sufijos mejorados (Abouelhoda, 2004). Los parámetros predeterminados utilizados fueron los siguientes: una longitud de repetición de 23 a 55 pb, un tamaño de espacio entre repeticiones de 25 a 60 pb, un 20% de desajuste de nucleótidos entre repeticiones. El otro criterio de búsqueda se basó en la determinación de la función CRISPR, para lo cual se agregan filtros para ayudar a validar un CRISPR, como la búsqueda de espaciadores no idénticos con un tamaño que debe ser de 0,6 * a 2,5 * el tamaño de la repetición. Este filtro está configurado para eliminar repeticiones en tándem. La comparación de los espaciadores se realizó alineándolos (utilizando los parámetros predeterminados del

or three repeated sequences or direct repeats (DR), are classified using a level of Evidence, rated from 1 to 4, where 1 includes small CRISPR (with 3 or fewer spacers) and 2 to 4 are classified based on the repetition and similarity of the spacer. This is because questionable CRISPR structures often tend to be byproducts of the CRISPRFinder identification that are not true CRISPR. Further, the tests to verify the internal preservation of the candidate repetitions and the divergence of the candidate spacers offered by CRISPRFinder are considered.

Bioinformatic analysis and statistical results

For the search of genes *cas*, the first step consisted in the identification of open reading frames (ORF) with Prodigal (Hyatt, 2010). Then these ORFs were analyzed by the MacSyFinder program by the models for the search of HMM genes (Hidden Markov Models) in a library of known Cas proteins (Abby, 2014). BLAST was used to identify the *cas* genes in the upstream and downstream sequences of the CRISPR and TIGRFAM loci (Horvath *et al.*, 2009). The *cas* type and subtype were found through the analysis of *cas* conglomerates, thanks to the CRISPRCas-Finder program (Grissa *et al.*, 2007b). The unique spacer sequences as well as their origin were identified by NCBI's multiple sequence alignment program with predetermined arguments. All spacers were compared with the GenBank database to find homologous sequences with matches of $\geq 85\%$ (minimum of 28/33 coincident nucleotides) (Horvath *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2017).

programa Muscle). El porcentaje de similitud de los espaciadores se calcula con la función percent_identity de la interfaz (Bio) perl (métodos AlignIO, interfaz Muscle), un parámetro establecido en 60%.

Para discriminar entre estructuras CRISPR confirmadas de aquellas cuestionables, las estructuras pequeñas similares a CRISPR, es decir, que tienen solo dos o tres secuencias repetidas o repeticiones directas (DR), se clasifican utilizando un nivel de evidencia, calificado de 1 a 4, donde 1 incluye pequeños CRISPR (con 3 o menos espaciadores) y 2 a 4 se clasifican en función de la repetición y similitud del espaciador. Esto se debe a que las estructuras CRISPR cuestionables a menudo tienden a ser subproductos de la identificación de CRISPRFinder que no son CRISPR verdadero. Además, se consideran las pruebas para verificar la preservación interna de las repeticiones candidatas y la divergencia de los espaciadores candidatos ofrecidos por CRISPRFinder.

Análisis bioinformático y resultados estadísticos

Para la búsqueda de genes *cas*, el primer paso consistió en la identificación de marcos de lectura abiertos (ORF) con Prodigal (Hyatt, 2010). Luego, estos ORF fueron analizados por el programa MacSyFinder mediante los modelos para la búsqueda de genes HMM (Hidden Markov Models) en una biblioteca de proteínas Cas conocidas (Abby, 2014). BLAST se usó para identificar los genes *cas* en las secuencias aguas arriba y aguas

Phylogenetic trees were generated based on the unweighted pair group method (UPGMA) for the core protein Cas, specifically Cas1 using the MUSCLE algorithm (Tamura *et al.*, 2013). In parallel, multiple sequence alignments and phylogenetic analyzes were performed using Clustal X, and dendograms were visualized with the accompanying application NJ Plot (Larkin *et al.*, 2007). The distance matrix was calculated using the Jaccard coefficient. The structure of Cas proteins was evaluated by multiple sequence alignments with Geneious global alignment (Needleman-Wunsch) with predetermined arguments (Shen *et al.*, 2017). The PubMLST database was used for the determination of the multilocus sequences and the sequence typing data were used for the goeBURST analysis (Shen *et al.*, 2017). The one-factor analysis of variance (ANOVA) was used as a statistical model to establish differences between the comparative parameters analyzed.

Results and discussion

The present study aims to offer an analysis of CRISPR/Cas gene sequences in microorganisms of high influence in aquaculture production associated with shrimp infections, specifically in the species of commercial interest *L. vannamei*, intending to offer alternatives for the control of pathogens of bacterial origin, through phagotherapy, a promising technology for shrimp farming based on the management of specific lytic phages of bacteria or their lytic enzymes (enzymotics).

abajo de los loci CRISPR y TIGRFAM (Horvath *et al.*, 2009). El tipo y subtipo *cas* se encontraron mediante el análisis de conglomerados *cas*, gracias al programa CRISPRCas-Finder (Grissa *et al.*, 2007b). Las secuencias espaciadoras únicas, así como su origen, fueron identificadas por el programa de alineación de secuencias múltiples del NCBI con argumentos predeterminados. Todos los espaciadores se compararon con la base de datos GenBank para encontrar secuencias homólogas con coincidencias de $\geq 85\%$ (mínimo de 28/33 nucleótidos coincidentes) (Horvath *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2017).

Los árboles filogenéticos se generaron con base en el método de grupos de pares no ponderados (UPGMA) para la proteína central Cas, específicamente Cas1, utilizando el algoritmo MUSCLE (Tamura *et al.*, 2013). En paralelo, se realizaron múltiples alineamientos de secuencia y análisis filogenéticos utilizando Clustal X, y los dendogramas se visualizaron con la aplicación adjunta NJ Plot (Larkin *et al.*, 2007). La matriz de distancias se calculó mediante el coeficiente de Jaccard. La estructura de las proteínas Cas se evaluó mediante múltiples alineamientos de secuencia con alineamiento global Geneious (Needleman-Wunsch) con argumentos predeterminados (Shen *et al.*, 2017). La base de datos PubMLST se utilizó para la determinación de las secuencias multilocus y los datos de tipificación de secuencias se utilizaron para el análisis goeBURST (Shen *et al.*, 2017). El análisis de varianza de

Organization and diversity of CRISPR/Cas systems in Vibrionaceae genome

Seven CRISPR structures were found in 5 genomes within the total (1104 genomes) of the family of proteobacteria Vibrionaceae studied, distributed in 3 *Vibrio* species (*V. parahaemolyticus* FORC_022, *V. harveyi* ATCC 43516, *V. vulnificus* YJ016 and 93U204) and in the related species *Photobacterium damselae* KC-Na-1 (formerly classified as *V. damselae*) whose characteristics are described in Table 1. Three different CRISPR/Cas arrays in *Vibrio* that have different locations on the chromosomes were detected (Figure 1).

un factor (ANOVA) se utilizó como modelo estadístico para establecer diferencias entre los parámetros comparativos analizados.

Resultados y discusión

El presente estudio tiene como objetivo ofrecer un análisis de secuencias de genes CRISPR/Cas en microorganismos de alta influencia en la producción acuícola asociados a infecciones del camarón, específicamente en la especie de interés comercial *L.vannamei*, con la intención de ofrecer alternativas para el control de patógenos de origen

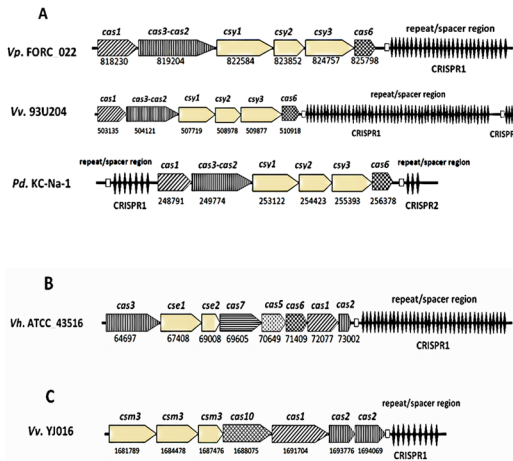


Figure 1. Architecture loci and gene organization of CRISPR systems in three different regions. A, type I-F; B, type I-E; C, type III-D. The black diamonds represent the CRISPR loci, and the white arrows (with lines in different directions) represent the different cas genes found. The relative position on the chromosome is indicated below each gene.

Figura 1. Loci de la Arquitectura y Organización genética de sistemas CRISPR en tres regiones diferentes. A, tipo I-F; B, tipo I-E; C, tipo III-D. Los diamantes negros representan los loci CRISPR y las flechas blancas (con líneas en diferentes direcciones) representan los diferentes genes cas encontrados. La posición relativa en el cromosoma se indica debajo de cada gen.

The types of CRISPR/Cas systems found correspond to types I-E, I-F and III-D. According to the relative location on the chromosome, the CRISPR loci were designated CRISPR1 and CRISPR2. To better distinguish the CRISPR/Cas system in the genus *Vibrio*, or in the members with CRISPR matrices found in the Vibrionaceae family, a phylogenetic tree was constructed based on the homology of the Cas1 proteins of each species (Figure 2).

bacteriano, a través de la fagoterapia, una tecnología prometedora para el cultivo de camarón basada en el manejo de fagos líticos específicos de bacterias o sus enzimas líticas (enzimbióticos).

Organización y diversidad de sistemas CRISPR / Cas en el genoma de Vibrionaceae

Se encontraron siete estructuras CRISPR en 5 genomas dentro del total (1104 genomas) de la familia

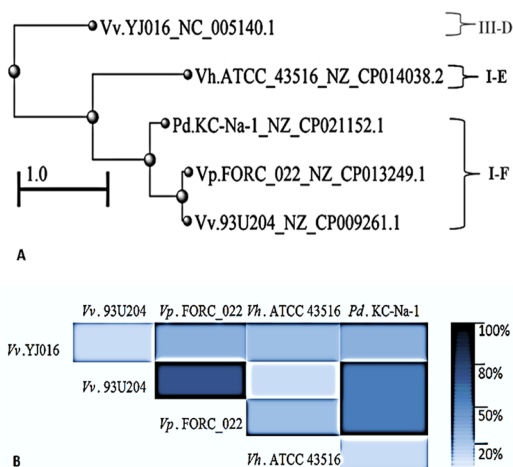


Figure 2. Phylogenetic tree for Cas1 proteins in the family Vibrionaceae. The UPGMA tree of the Cas1 protein was generated using the MUSCLE algorithm in MEGA6. The Cas1 proteins representative of the subtypes found were selected (I-F, I-E and III-D) (A). Percentage identity of Cas1 proteins in the Vibrionaceae genomes studied. (B). *Vp.* FORC_022, *Vh.* ATCC 43516, *Vv.* YJ016 and 93U204, *Pd.* KC-Na-1, are the abbreviations of *V. parahaemolyticus* FORC_022, *V. harveyi* ATCC 43516, *V. vulnificus* YJ016 and 93U204, and *P. damsela* KC-Na-1, respectively.

Figura 2. Árbol filogenético de las proteínas Cas1 de la familia Vibrionaceae. El árbol UPGMA de la proteína Cas1 se generó utilizando el algoritmo MUSCLE en MEGA6. Se seleccionaron las proteínas Cas1 representativas de los subtipos encontrados (I-F, I-E y III-D) (A). Porcentaje de identidad de las proteínas Cas1 en los genomas de Vibrionaceae estudiados. (B). *Vp.* FORC_022, *Vh.* ATCC 43516, *Vv.* YJ016 y 93U204, *Pd.* KC-Na-1, son las abreviaturas de *V. parahaemolyticus* FORC_022, *V. harveyi* ATCC 43516, *V. vulnificus* YJ016 y 93U204, y *P. damsela* KC-Na-1, respectivamente.

However, it is important to note that since few confirmed CRISPR sequences have been obtained in the genomes of interest to date, this may make it difficult to establish a more adequate phylogenetic relationship, so our results represent only a limited approximation of the relationship based only on the conservation of Cas1, and can be seen as an internal control of the previous classification performed by the CRISPRdb database and the CRISPRFinder (Grissa *et al.*, 2007a, b). We recommend performing a phylogenetic analysis with a greater number of genomic sequences (including partial genomes) and that include CRISPR systems with different levels of confidence to obtain a better discriminatory phylogenetic relationship. The distinction between the type of CRISPR found by the analysis of direct repeat (DR) sequence was also evaluated (Figure 3). Typical CRISPR matrices were observed with a minimum of 4 to a maximum of 56 DR, which had a length between 28-35 bp. The DR were therefore found to be interspaced, with a minimum of 3 to a maximum of 55 spacer sequences of a similar length between 31-43 bp. Despite the fact that most of the spacer sequences presented a size of 32 bp, the analysis of variance indicates that there is no statistically significant difference ($p > 0.01$) that allows to point out that the obtained means corresponding to the number and size of the spacer sequences are different from each other.

de proteobacterias Vibrionaceae estudiadas, distribuidas en 3 especies de *Vibrio* (*V. parahaemolyticus* FORC_022, *V. harveyi* ATCC 43516, *V. vulnificus* YJ016 y 93U204) y en la especie relacionada *Photobacterium damsela* KC-Na-1 (anteriormente clasificada como *V. damsela*) cuyas características se describen en la Tabla 1. Se detectaron tres matrices CRISPR/Cas diferentes en *Vibrio* que tienen diferentes ubicaciones en los cromosomas (Figura 1).

Los tipos de sistemas CRISPR/Cas encontrados corresponden a los tipos I-E, I-F y III-D. Según la ubicación relativa en el cromosoma, los loci CRISPR se denominaron CRISPR1 y CRISPR2. Para distinguir mejor el sistema CRISPR/Cas en el género *Vibrio*, o en los miembros con matrices CRISPR encontradas en la familia Vibrionaceae, se construyó un árbol filogenético basado en la homología de las proteínas Cas1 de cada especie (Figura 2).

Sin embargo, es importante señalar que dado que hasta la fecha se han obtenido pocas secuencias CRISPR confirmadas en los genomas de interés, esto puede dificultar el establecimiento de una relación filogenética más adecuada, por lo que nuestros resultados representan solo una aproximación limitada de la relación basada únicamente sobre la conservación de Cas1, y puede verse como un control interno de la clasificación anterior realizada por la base de datos CRISPRdb y el CRISPRFinder (Grissa *et al.*, 2007a, b). Recomendamos realizar un análisis filogenético con un mayor

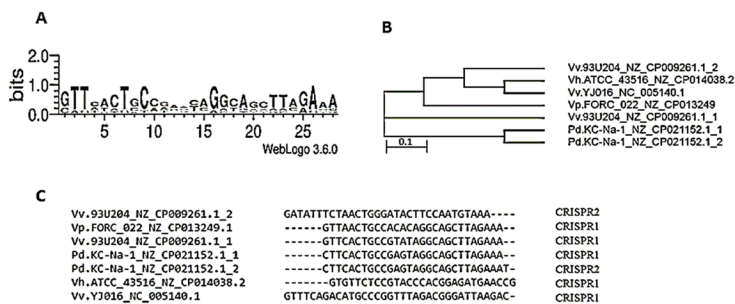


Figure 3. Conservation of direct repetitions (DR) (A) the logo of the sequence was created by WebLogo 3.6.0, and the comparative analysis of the CRISPR repeats (B and C). Seven repeated CRISPR sequences were aligned using ClustalX (Horvath *et al.*, 2009) or generated using the MUSCLE algorithm in MEGA6. Vp. FORC_022, Vh. ATCC 43516, Vv. YJ016 and 93U204, Pd. KC-Na-1, are the abbreviations of *V. parahaemolyticus* FORC_022, *V. harveyi* ATCC 43516, *V. vulnificus* YJ016 and 93U204, and *P. damsela* KC-Na-1, respectively.

Figura 3. Conservación de repeticiones directas (DR) (A) el logo de la secuencia fue creado por WebLogo 3.6.0, y el análisis comparativo de las repeticiones CRISPR (B y C). Se alinearon siete secuencias CRISPR repetidas usando ClustalX (Horvath *et al.*, 2009) o se generaron usando el algoritmo MUSCLE en MEGA6. Vp. FORC_022, Vh. ATCC 43516, Vv. YJ016 y 93U204, Pd. KC-Na-1, son las abreviaturas de *V. parahaemolyticus* FORC_022, *V. harveyi* ATCC 43516, *V. vulnificus* YJ016 y 93U204, y *P. damsela* KC-Na-1, respectivamente.

However, there is a very low correlation between the number and size presented by these sequences (Figure 4). The total number of spacers detected per type of CRISPR was 96/142 for types I-F (68 %), 37/142 for type I-E (26 %) and 9/142 for type III-D (6 %). The observed CRISPR structures exhibited between 6 to 8 genes associated with the CRISPR sequences (*cas*) (Table 1).

The presence of I-F subtypes corresponds to what has been described in the literature in strains of the genus such as *V. cholerae* O1/O139, in which, after bioinformatic analysis, CRISPR/Cas modules containing

número de secuencias genómicas (incluyendo genomas parciales) y que incluyan sistemas CRISPR con diferentes niveles de confianza para obtener una mejor relación filogenética discriminadora. También se evaluó la distinción entre el tipo de CRISPR encontrado por el análisis de secuencia de repetición directa (DR) (Figura 3). Se observaron matrices CRISPR típicas con un mínimo de 4 a un máximo de 56 DR, que tenían una longitud entre 28-35 pb. Por lo tanto, se encontró que las DR estaban interespaciadas, con un mínimo de 3 a un máximo de 55 secuencias espaciadoras de una longitud

the genes encoding the Cas1, Cas3 proteins have been identified and Cas6, and based on the sequences of proteins and their organization, have been grouped in CRISPR/Cas systems of type I-F (Labbate *et al.*, 2016), as well as in clinical isolates of the species *V. parahaemolyticus* in which the I-F CRISPR/Cas subtype has been described (Sun *et al.*, 2015). Likewise, the presence of I-E subtypes has been reported in strains of the genus such as *V. cholerae* O395, in which 3 *cas* core genes (*cas1*, *cas2* and *cas3*) and 5 specific genes of the I-E subtype (*cse1*, *cse2*, *cse3*, *cse4*, *cas5e*) have been identified (Chakraborty *et al.*, 2009; Box *et al.*, 2016).

similar entre 31 y 43 pb. A pesar de que la mayoría de las secuencias espaciadoras presentaron un tamaño de 32 pb, el análisis de varianza indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.01$) que permita señalar que las medias obtenidas correspondientes al número y tamaño de las secuencias espaciadoras son diferentes entre sí.

Sin embargo, existe una correlación muy baja entre el número y el tamaño que presentan estas secuencias (Figura 4). El número total de espaciadores detectados por tipo de CRISPR fue 96/142 para los tipos I-F (68%), 37/142 para el tipo I-E (26%) y 9/142 para el tipo III-D (6%).

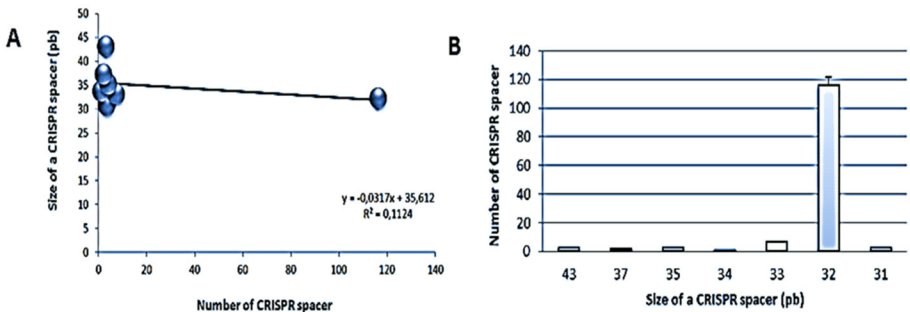


Figure 4. Correlation of the number of spacers in the CRISPR loci and the size of the CRISPR (bp) spacers found. A very low negative correlation was found ($\leq 30\%$) (A). Variability of the size of the CRISPR spacers and their number ($p > 0.05$). The x-axis represents the size of a CRISPR spacer, in nucleotides. The y-axis represents the number of CRISPR spacing sequences of a given size (B).

Figura 4. Correlación del número de espaciadores en los loci CRISPR y el tamaño de los espaciadores CRISPR (bp) encontrados. Se encontró una correlación negativa muy baja ($\leq 30\%$) (A). Variabilidad del tamaño de los espaciadores CRISPR y su número ($p > 0,05$). El eje X representa el tamaño de un espaciador CRISPR, en nucleótidos. El eje Y representa el número de secuencias de espaciado CRISPR de un tamaño dado (B).

On the other hand, it has been reported that CRISPR Type I-E systems always have two loci pairs, at least that is what has been evidenced in enterobacteria genomes (Shen *et al.*, 2017). However, our results differ from the aforementioned, since in the species *V. harveyi* ATCC 43516 only, a confirmed CRISPR structure was detected, such as that described in strains such as *V. cholerae* O395 (Chakraborty *et al.*, 2009).

Interestingly, a new form of disposition of *cas* genes was found for the Type III-D subtype detected in *V. vulnificus* YJ016. Although according to the current classification model (Makarova *et al.*, 2015), it should still be a CRISPR/Cas type III-D system because the *cas* genes found are within the subtype arrangement III-D, however, a pair of *cas2* genes was detected as well as the *cas1* gene at chromosomal location 1693776-1694069 bp and 1691704 bp, respectively. This does not correspond to the genes of subtype III-D, and rather, they remind us of the arrangement of the subtype III-A architectures, which possess both the *cas10* and *cas3* genes of type III-D, and a *cas* nucleus represented by the *cas1* and *cas2* (Makarova *et al.*, 2015), therefore it is in the presence of two very closely related subtypes, and with a possible common origin.

The origin of CRISPR spacers

Of the 130/142 (92 %) unique spacer sequences found in the CRISPR loci detected, it is important to note that all had homology with some sequence contained in the GenBank database, as well as a great diversity

Las estructuras CRISPR observadas exhibieron entre 6 y 8 genes asociados con las secuencias CRISPR (*cas*) (Cuadro 1).

La presencia de subtipos I-F corresponde a lo descrito en la literatura en cepas del género como *V. cholerae* O1/O139, en las que, tras análisis bioinformático, se han estudiado módulos CRISPR/Cas que contienen los genes que codifican las proteínas Cas1, Cas3, Cas4, Cas5 y Cas6, y en base a las secuencias de proteínas y su organización, se han agrupado en sistemas CRISPR/Cas de tipo IF (Labbate *et al.*, 2016), como en aislados clínicos de la especie *V. parahaemolyticus* en la que el subtipo CRISPR/Cas I-F si se ha descrito (Sun *et al.*, 2015). Asimismo, se ha reportado la presencia de subtipos de I-E en cepas del género como *V. cholerae* O395, en el que 3 genes del núcleo *cas* (*cas1*, *cas2* y *cas3*) y 5 genes específicos del subtipo I-E (*cse1*, *cse2*, *cse3*, *cse4*, *cas5e*) han sido identificados (Chakraborty *et al.*, 2009; Box *et al.*, 2016).

Por otro lado, se ha reportado que los sistemas CRISPR tipo I-E siempre tienen dos pares de loci, al menos eso es lo que se ha evidenciado en genomas de enterobacterias (Shen *et al.*, 2017). Sin embargo, nuestros resultados difieren de los anteriores, ya que en la especie *V. harveyi* ATCC 43516 únicamente se detectó una estructura CRISPR confirmada, como la descrita en cepas como *V. cholerae* O395 (Chakraborty *et al.*, 2009).

Curiosamente, se encontró una nueva forma de disposición de genes *cas* para el subtipo III-D detectado

in relation to the presented homology to related or not sequences with the family of proteobacteria Vibrionaceae. 53 % of the spacers (75/142) presented homology with extrachromosomal genetic material, while the remaining 47 % of the spacer sequences (67/142) exhibited homology with bacteriophages (Figure 5). Results that indicate a clear immunity function against foreign genetic material (plasmids or phages) and a high specificity of the different CRISPR/Cas systems studied. The type of CRISPR that gathered the greatest number of spacer sequences was the I-F type present in the species *P. damsela* KC-Na-1, *V. parahaemolyticus* FORC_022 and *V. vulnificus* 93U204, who exhibited 10/96 (10.4 %), 28/96 (29.2 %) and 58/96 (60.4 %) spacer sequences respectively. In types I-E and III-D found in species *V. harveyi* ATCC 43516 and *V. vulnificus* YJ016 respectively, were observed 37 and 9 corresponding spacer sequences (Figure 5).

It is important to note that the spacer sequences found in the CRISPR type I-E were the ones that presented a greater homology to bacteriophage sequences with 76 % (28/37) followed by type III-D with 56 % (5/9) and in smaller proportion, the I-F type with 35 % (34/96). Interestingly, on the contrary, the spacers found in type I-F exhibited the highest homology to plasmid sequences with 65 % (62/96) (Figure 5). The homologies evidenced by the spacer sequences studied indicated a high diversity in terms of the recognition targets of the CRISPR

en *V. vulnificus* YJ016. Aunque de acuerdo con el modelo de clasificación actual (Makarova *et al.*, 2015), aún debería ser un sistema CRISPR/Cas tipo III-D porque los genes *cas* encontrados están dentro del arreglo de subtipos III-D, sin embargo, un par de genes *cas2* se detectó, así como el gen *cas1* en la ubicación cromosómica 1693776-1694069 bp y 1691704 bp, respectivamente. Esto no se corresponde con los genes del subtipo III-D, sino que nos recuerdan la disposición de las arquitecturas del subtipo III-A, que poseen los genes *cas10* y *cas3* del subtipo III-D, y un núcleo *cas* representado por el *cas1* y *cas2* (Makarova *et al.*, 2015), por lo que se encuentra en presencia de dos subtipos muy relacionados, y con un posible origen común.

El origen de los espaciadores CRISPR

De las 130/142 (92%) secuencias espaciadoras únicas encontradas en los loci CRISPR detectados, es importante señalar que todas tenían homología con alguna secuencia contenida en la base de datos GenBank, así como una gran diversidad en relación con la homología presentada con secuencias relacionadas o no con la familia de proteobacterias Vibrionaceae. El 53% de los espaciadores (75/142) presentaron homología con material genético extracromosómico, mientras que el 47% restante de las secuencias espaciadoras (67/142) exhibieron homología con bacteriófagos (Figura 5). Resultados que indican una clara función de inmunidad frente a material genético extraño (plásmidos o fagos) y una alta especificidad de

immunity systems examined, represented by the homology to DNA sequences related or not to representatives of the Vibrionaceae family. Specifically, there is little immunity to typical *Vibrio* infective bacteriophages (Figure 5) such as phage VP2, phage Douglas 12A4 and phage VSK (the latter is also a host of *P. damsela* KC-Na-1) and to plasmid sequences also present in strains of the genus *Vibrio* (Figure 5) such as p380 of *V. coralliilyticus* RE98, plasmid QT6D1 of *V. shilonii* strain, plasmid pMJ100 of *V. fischeri* MJ11 and plasmid pYJ016 of *V. vulnificus* YJ016 (spacers found at some of the CRISPR loci type I-F observed), or against phage of *Vibrio* 11895-B1 and plasmid p48/10 of *V. vulnificus* 48/10 (in the CRISPR system type I-E detected), or against phage of *Vibrio eugene* 12A10 and plasmid pSNUTY1 of *V. coralliilyticus* strain SNUTY-1 (in the CRISPR system type III-D studied). Like the immunity found in higher proportion against a great variety of infective phages of *Bacillus*, Enterobacteria, *Pseudomonas* and Cyanobacteria (results not shown). The results obtained show a low occurrence of CRISPR structures in these Vibrionaceae species, that provide them with immunity to lytic specific phages, especially of the *Vibrio* genus, which is important, considering that this sensitivity can be explored for the development of analytical tools such as phage therapy in shrimp culture, a technology based on the use of enzymes or phages for the control of typical shrimp pathogens.

los diferentes sistemas CRISPR/Cas estudiados. El tipo de CRISPR que reunió el mayor número de secuencias espaciadoras fue el tipo I-F presente en las especies *P. damsela* KC-Na-1, *V. parahaemolyticus* FORC_022 y *V. vulnificus* 93U204, quienes exhibieron 10/96 (10,4%), 28/96 (29,2%) y 58/96 (60,4%) secuencias espaciadoras respectivamente. En los tipos I-E y III-D encontrados en las especies *V. harveyi* ATCC 43516 y *V. vulnificus* YJ016 respectivamente, se observaron 37 y 9 secuencias espaciadoras correspondientes (Figura 5).

Es importante señalar que las secuencias espaciadoras encontradas en el CRISPR tipo I-E fueron las que presentaron una mayor homología con las secuencias de bacteriófagos con 76% (28/37) seguidas del tipo III-D con 56% (5/9) y en menor proporción, el tipo I-F con 35% (34/96). Curiosamente, por el contrario, los espaciadores encontrados en el tipo I-F exhibieron la mayor homología con las secuencias de plásmido con 65% (62/96) (Figura 5). Las homologías evidenciadas por las secuencias espaciadoras estudiadas indicaron una alta diversidad en términos de las dianas de reconocimiento de los sistemas de inmunidad CRISPR examinados, representada por la homología con secuencias de DNA relacionadas o no con representantes de la familia Vibrionaceae. Específicamente, hay poca inmunidad a los bacteriófagos infecciosos típicos de *Vibrio* (Figura 5) como el fago VP2, el fago Douglas 12A4 y el fago VSK (este último también es un hospedador de *P. damsela* KC-Na-1) y a las secuencias de plásmidos

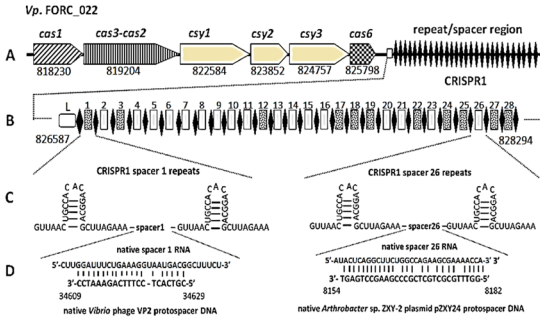


Figure 5. The origin of CRISPR spacers. General description of the CRISPR locus (A), Spacers acquired in phage or plasmid resistance (B). The CRISPR locus of *V. parahaemolyticus* FORC_022 (Type I-F) and *V. vulnificus* YJ016 (Type III-D) is in the upper part. The region of spacers and repeats are in the middle: repeats (black diamonds), spacers (gray or dotted squares numbered, gray, for sequences with homology for plasmids and dotted, for homology with phage), leader (L, white box). (Below) the content of the spacer is detailed (C) and the sequences with homology to phages or plasmids (D). The global distribution of CRISPR spacers in plasmids and phages (E) and for the type (F) was determined by sequence identity. All spacers were compared against the GenBank database to find a sequence of homology.

Figura 5. El origen de los espaciadores CRISPR. Descripción general del locus CRISPR (A), Espaciadores adquiridos en fagos o resistencia a plásmidos (B). El locus CRISPR de *V. parahaemolyticus* FORC_022 (Tipo I-F) y *V. vulnificus* YJ016 (Tipo III-D) se encuentra en la parte superior. La región de espaciadores y repeticiones está en el medio: repeticiones (rombos negros), espaciadores (cuadrados grises o punteados numerados, gris, para secuencias con homología para plásmidos y punteados, para homología con fagos), líder (L, recuadro blanco). (A continuación) se detalla el contenido del espaciador (C) y las secuencias con homología a fagos o plásmidos (D). La distribución global de espaciadores CRISPR en plásmidos y fagos (E) y para el tipo (F) se determinó por identidad de secuencia. Todos los espaciadores se compararon con la base de datos GenBank para encontrar una secuencia de homología.

The 92 % of the unique spacer sequences found in the CRISPR loci presented homology with some sequence contained in the GenBank database against extrachromosomal genetic material (plasmids) or bacteriophages, which is indicative of a clear immunity function against foreign genetic material and of a high specificity of the different CRISPR/Cas systems studied. It has been described

también presentes en cepas del género *Vibrio* (Figura 5) tales como p380 de *V. coralliilyticus* RE98, plásmido QT6D1 de la cepa de *V. shilonii*, plásmido pMJ100 de *V. fischeri* MJ11 y plásmido pYJ016 de *V. vulnificus* YJ016 (espaciadores encontrados en algunos de los loci CRISPR tipo I-F observado), o contra el fago de *Vibrio* 11895-B1 y el plásmido p48/10 de *V. vulnificus* 48/10 (en el sistema

that the CRISPR/Cas system provides immunity against the virus in prokaryotes, thanks to the fact that the spacers are obtained from invading elements and in this way the cell can mediate the immune reaction in a specific way by recognizing the homologous sequence of such a spacer (Barrangou and Horvath, 2017). Therefore, the profile of spacers can be a reflection of the bacterial lifestyle or of their habitat (Horvath *et al.*, 2009). In this study, it is important to note that most of the spacer sequences studied confer immunity to plasmids (53 %). Likewise, spacer sequences were found against a wide variety of infective phages from *Bacillus*, Enterobacteria, *Pseudomonas* and Cyanobacteria.

Conclusion

The results obtained in this research are very promising because they show a low occurrence of CRISPR structures in these species Vibrionaceae with immunity to lytic-specific phages of the genus *Vibrio*, which is important if we consider that this sensitivity can be explored for the development of strategies such as phagotherapy in shrimp farming, a technology based on the use of enzymes or phages for the control of typical shrimp pathogens, reducing in this way the losses caused by infections of shrimp farms.

CRISPR el tipo I-E detectado), o contra el fago de *V. eugene* 12A10 y el plásmido pSNUTY1 de la cepa de *V. coralliilyticus* SNUTY-1 (en el sistema CRISPR tipo III-D estudiado). Como la inmunidad encontrada en mayor proporción contra una gran variedad de fagos infecciosos de *Bacillus*, Enterobacteria, *Pseudomonas* y Cyanobacteria (resultados no mostrados). Los resultados obtenidos muestran una baja ocurrencia de estructuras CRISPR en estas especies de Vibrionaceae, que las dotan de inmunidad frente a fagos líticos específicos, especialmente del género *Vibrio*, lo cual es importante, considerando que esta sensibilidad puede ser explorada para el desarrollo de herramientas analíticas como terapia de fagos en cultivo de camarón, una tecnología basada en el uso de enzimas o fagos para el control de patógenos típicos del camarón.

El 92% de las secuencias espaciadoras únicas encontradas en los loci CRISPR presentaron homología con alguna secuencia contenida en la base de datos GenBank contra material genético extracromosómico (plásmidos) o bacteriófagos, lo que es indicativo de una clara función de inmunidad contra material genético extraño y de una alta especificidad de los diferentes sistemas CRISPR/Cas estudiados. Se ha descrito que el sistema CRISPR/Cas proporciona inmunidad frente al virus en procariontas, gracias a que los espaciadores se obtienen a partir de elementos invasores y de esta forma la célula puede mediar la reacción inmune de forma específica al reconocer la secuencia homóloga. de

End of English Version

tal espaciador (Barrangou y Horvath, 2017). Por lo tanto, el perfil de los espaciadores puede ser un reflejo del estilo de vida bacteriano o de su hábitat (Horvath *et al.*, 2009). En este estudio, es importante señalar que la mayoría de las secuencias espaciadoras estudiadas confieren inmunidad a los plásmidos (53%). Asimismo, se encontraron secuencias espaciadoras contra una amplia variedad de fagos infecciosos de *Bacillus*, Enterobacteria, *Pseudomonas* y Cyanobacteria.

Conclusión

Los resultados obtenidos en esta investigación son muy prometedores porque muestran una baja ocurrencia de estructuras CRISPR en estas especies Vibrionaceae con inmunidad a fagos líticos específicos del género *Vibrio*, lo cual es importante si consideramos que esta sensibilidad puede ser explorada para el desarrollo de estrategias como la fagoterapia en el cultivo de camarón, una tecnología basada en el uso de enzimas o fagos para el control de patógenos típicos del camarón, reduciendo de esta manera las pérdidas ocasionadas por infecciones de las granjas camaroneras.

Cited literature

Abby, S., B. Néron., H. Ménager., M. Touchon and E. Rocha. 2014. MacSyFinder: a program to mine genomes for molecular systems with an application to CRISPR-Cas systems. *PloS one*. 9(10): e110726.

Abouelhoda, M., S. Kurtz and E. Ohlebusch. 2004. Replacing suffix trees with enhanced suffix arrays. *J. Discrete Algorithms*. 2(1): 53-86.

Aguirre, G., J. Sánchez, R. Pérez, A. Palacios, T. Trujillo and N. de la Cruz. 2010. Pathogenicity and infection route of *Vibrio parahaemolyticus* in american white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.* 41(3): 464-470.

Alagappan, K., D. Deivasigamani, S. Somasundaram and S. Kumaran. 2010. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and its specific phages from shrimp ponds in east coast of India. *Curr. Microbiol.* 61(4): 235-240.

Barrangou, R. and P. Horvath. 2017. A decade of discovery: CRISPR functions and applications. *Nat. Microbiol.* 2(7): 17092.

Benson, D., I. Karsch, D. Lipman., J. Ostell and D. Wheeler. 2008. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 36(Database issue): D25.

Bernal, A., U. Ear and N. Kyrpides. 2001. Genomes OnLine Database (GOLD): a monitor of genome projects worldwide. *Nucleic Acids Res.* 29(1): 126-127.

Box, A., M. McGuffie., B. O'Hara and K. Seed. 2016. Functional analysis of bacteriophage immunity through a type I-E CRISPR/Cas system in *Vibrio cholerae* and its application in bacteriophage genome engineering. *J. Bacteriol.* 198(3): 578-590.

Chakraborty, S., T. Waise., F. Hassan., Y. Kabir., M. Smith and M. Arif. 2009. Assessment of the Evolutionary Origin and Possibility of CRISPR-Cas (CASS) Interference Pathway in *Vibrio cholerae* O395. *In silico biology*. 9(4): 245-254.

Cheng, L., J. Huang, C. Shi, K. Thompson, B. Mackey and J. Cai. 2008. *Vibrio parahaemolyticus* associated with mass mortality of postlarval abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* (L.), in Sanya, China. *J. World Aquac. Soc.* 39(6): 746-757.

Grissa, I., G. Vergnaud and C. Pourcel. 2007a. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res.* 35 (suppl 2): W52-W57.



- Grissa, I., G. Vergnaud and C. Pourcel. 2007b. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*. 8(1):172.
- Horvath, P., A. Côté, D. Romero, P. Boyaval., C. Fremaux and R. Barrangou. 2009. Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *Int. J. Food. Microbiol.* 131(1): 62-70.
- Horvath, P. and R. Barrangou. 2010. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*. 327(5962): 167-170.
- Hyatt, D., G. Chen., P. LoCascio., M. Land., F. Larimer and L. Hauser. 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC bioinformatics*. 11(1): 119.
- Kalatzis, P., D. Castillo, P. Katharios and M. Middelboe. 2018. Bacteriophage interactions with marine pathogenic *Vibrios*: Implications for phage therapy. *Antibiot.* 7(1): 15.
- Kurtz, S and C. Schleiermacher. 1999. REPuter: fast computation of maximal repeats in complete genomes. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 15(5): 426-427.
- Labbate, M., F. Orata., N. Petty., N. Jayatilake., W. King., P. Kirchberger and Y. Boucher. 2016. A genomic island in *Vibrio cholerae* with VPI-1 site-specific recombination characteristics contains CRISPR-Cas and type VI secretion modules. *Sci. Rep.* 6: 36891.
- Larkin, M., G. Blackshields., N. Brown., R. Chenna., P. McGettigan., H. McWilliam and J. Thompson, J. D. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23(21): 2947-2948.
- Lomelí, C. and S. Martínez. 2014. Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture*. 434: 208-211.
- Lyons, C., N. Raustad., M. Bustos and M. Shiaris. 2015. Incidence of Type II CRISPR1-Cas Systems in *Enterococcus* Is Species-Dependent. *PLoS one*. 10(11): e0143544.
- Makarova, K., Y. Wolf., O. Alkhnbashi., F. Costa., S. Shah., S. Saunders and P. Horvath. 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 13(11): 722.
- Oliveira, J., F. Castilho., A. Cunha and M. Pereira. 2012. Bacteriophage therapy as a bacterial control strategy in aquaculture. *Aquacult. Int.* 20(5): 879-910.
- Rice, L. and Stokes, L. 2008. Federal Funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*. 197(8): 1079-1081.
- São, C. 2018. Engineering of phage-derived lytic enzymes: Improving their potential as antimicrobials. *Antibiot.* 7(2): 29.
- Shen, J., L. Lv., X. Wang., Z. Xiu and G. Chen. 2017. Comparative analysis of CRISPR Cas systems in *Klebsiella* genomes. *J. Basic Microbiol.* 57(4): 325-336.
- Sun, H., Y. Li., X. Shi., Y. Lin., Y. Qiu., J. Zhang and Q. Sun. 2015. Association of CRISPR/Cas evolution with *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors and genotypes. *Foodborne Pathog Dis.* 12(1): 68-73.
- Tamura, K., G. Stecher., D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12): 2725-2729.
- Yooseph, S., K. Nealson., D. Rusch., J. McCrow., C. Dupont., M. Kim., J. Johnson., R. Montgomery., S. Ferreira and K. Beeson. 2010. Genomic and functional adaptation in surface ocean planktonic prokaryotes. *Nature*. 468(7320): 60-66.
- Won, K. and S. Park. 2008. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to cultured marine fishes in Korea. *Aquaculture*. 285(1-4): 8-13.

Incidencia del sombreado, biorreguladores y bioestimulante en el desarrollo y rendimiento del pasto Mombaza (*Panicum maximum* Jacq.)

Incidence of the shading, bioregulators and biostimulant on the growth and yield of Mombaza grass (*Panicum maximum* Jacq.)

Incidência do sombreamento, biorreguladores e bioestimulante no desenvolvimento e rendimento da grama Mombaza (*Panicum maximum* Jacq.)

Leonardo R. Jácome-Gómez^{1*} y Maribel del C. Ramírez-Villalobos²

¹Instituto Superior Tecnológico Tsáchila. Av. Galo Luzuriaga y Calle B. Santo Domingo, Ecuador. Correo electrónico: leonardojacome@tsachila.edu.ec, , ²Departamento de Botánica. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia (LUZ). Maracaibo, Venezuela. Correo electrónico: mramire@fa.luz.edu.ve, .

Resumen

Las técnicas de sombreado (S), biorreguladores (BR) y bioestimulantes (BE) son alternativas que favorecen la brotación y producción de los pastos. El objetivo fue evaluar el efecto del S, BR y BE en el desarrollo y rendimiento del pasto Mombaza en Ecuador. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones y arreglo de tratamientos en parcelas divididas, en la principal representada por condición de S (S_1 : plena exposición solar, S_2 : sombra con árboles) y la secundaria por aplicación de BR y BE (A_0 : testigo; A_1 : dosis mínima de BR, 250 mL.ha⁻¹ Cytokin + 10 g.ha⁻¹ New Gibb 10 %; A_2 : dosis máxima de BR, 500 mL.ha⁻¹ Cytokin + 20 g.ha⁻¹ New Gibb 10 %; A_3 : dosis comercial del BE Algamar, algas marinas, 750 g.ha⁻¹). Se efectuaron tres cortes del pasto, a los 35 días de iniciado el experimento, en cada uno se evaluaron altura de macolla (AM), número de macollas.m⁻² (NMM), número de tallos. macolla⁻¹ (NTM) y rendimiento de materia seca (RMS). Se encontraron efectos

Recibido el 29-06-2020 • Aceptado el 14-10-2020.

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: leonardojacome@tsachila.edu.ec

($p < 0,05$) de S sobre las cuatro variables en cada corte y de la aplicación de BR y BE en AM en el corte 1, periodo de mínima precipitación; la interacción S con aplicación de BR y BE no influyó en las variables. Se concluye que el pasto cultivado en S_1 aumentó el desarrollo y RMS en los cortes 1, 2 y 3 (0,180; 0,300 y 0,398 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$). NMM se vio favorecido con S_2 y AM con la dosis mínima de BR.

Palabras clave: citocininas, giberelinas, algas marinas, materia seca, macolla.

Abstract

Shading (S), bioregulators (BR) and biostimulants (BS) techniques are alternatives that promote sprouting and production of grass. The objective was to evaluate the effect of S, BR and BS on the growth and yield of Mombaza grass in Ecuador. A complete randomized block design, with split plot arrangement and three replications, was used, the main plot represented by condition S (S_1 : full solar exposure, S_2 : shade of trees) and secondary one by BR and BS application (A_0 : control; A_1 : minimum doses of BR, 250 $\text{mL}\cdot\text{ha}^{-1}$ Cytokin + 10 $\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}$ New Gibb 10 %; A_2 : maximum doses of BR, 500 $\text{mL}\cdot\text{ha}^{-1}$ Cytokin + 20 $\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}$ New Gibb 10 %; A_3 : commercial dose of BS Algamar, seaweed, 750 $\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}$). Three cuts of grass were made, 35 days after starting experiment; in each one, tiller height (TH), number of tillers. m^{-2} (NTM) and stems.tiller $^{-1}$ (NST), and dry matter yield (DMY) were evaluated. It is found effects ($P < 0,05$) of S on the four variables in each cut; and application of BR and BS on TH in cuts 1, period of least precipitation. It is concluded that the grass cultivated in S_1 increased the growth and DMY in cuts 1, 2 and 3 (0.180, 0.300 y 0.398 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$). NTM was stimulated with S_2 and TH with the minimum dose of BR.

Key words: cytokinins, gibberellins, seaweeds, dry matter, tiller.

Resumo

Técnicas de sombreamento (S), biorreguladores (BR) e bioestimulantes são alternativas que favorecem o surgimento e a produção de gramíneas. O objetivo foi avaliar o efeito do S, BR e BE no desenvolvimento e rendimento do capim Mombaza. Utilizou-se delineamento de blocos ao acaso com três repetições e arranjo de tratamento em parcelas divididas, sendo a principal representada pela condição S (S_1 : exposição ao sol total, S_2 : sombra com árvores) e a secundária pela aplicação de BR e BE (A_0 : controle; A_1 : dose mínima de BR, 250 $\text{mL}\cdot\text{ha}^{-1}$ Cytokin + 10 $\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}$ New Gibb 10%; A_2 : dose máxima de BR, 500 $\text{mL}\cdot\text{ha}^{-1}$ Cytokin + 20 $\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}$ New Gibb 10%; A_3 : dose comercial de BS Algamar, alga, 750 $\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}$). Foram feitos três cortes de grama, 35 dias após o início do experimento; em cada um, altura de moita (AM), número de moita. m^{-2} (NMM) e hastes.moita $^{-1}$ (NHM) e rendimento de matéria seca (RMS). Efeitos significativos ($p < 0,05$) de

S foram encontrados nas quatro variáveis nas três seções e da ABB aplicação de BR e BE no corte 1 (período de menor precipitação); a interação S com aplicação de BR e BE não influenciou as variáveis. Conclui-se que a gramínea cultivada em S₁ aumentou o desenvolvimento e RMS nos cortes 1, 2 e 3 (0,180, 0,300 e 0,398 kg.ha⁻²). NMM foi favorecido com S₂ e AM com a dose mínima de BR.

Palavras-chave: citocinas, giberelinas, algas marinhas, matéria seca, moita.

Introducción

Los pastos en los trópicos son considerados una herramienta imprescindible en la producción bovina porque suplen la demanda de fibras y proteínas del animal que influyen directamente en la calidad de la leche y la carne y, por ende, en la dieta humana (Plana *et al.*, 2016). En Ecuador, el 45,74 % de la superficie de la provincia Santo Domingo de los Tsáchilas (117.796 ha) está dedicada a la ganadería bovina (INEC, 2019) y cultivada con varios pastos, entre ellos Mombaza (*Panicum maximum* Jacq.). Esta especie se introdujo en América en 1967, presenta alta producción de forraje (33 t.ha⁻¹.año⁻¹ de materia seca) y proporción hoja-tallo, buena calidad nutricional, rápida recuperación después del pastoreo y tolerancia a contenidos altos de humedad temporales en el suelo (Jank, 1995).

La mayoría de productores de la zona acuden a la fertilización mineral que resulta costosa y altamente contaminante para el ambiente, sin embargo, en varios sistemas de producción bovina de dicha provincia se ha observado que la producción y la calidad del pasto son de mediana a baja, debido a la falta de técnicas que favorezcan el desarrollo de la planta, entre las cuales se hallan el

Introduction

Pastures in the tropics are considered an essential tool in bovine production because they supply the animal's demand for fibers and proteins that directly influence the quality of milk and meat and, therefore, the human diet (Plana *et al.*, 2016). In Ecuador, 45.74 % of the surface of the Santo Domingo de los Tsáchilas province (117,796 ha) is dedicated to bovine livestock (INEC, 2019) and cultivated with various pastures, including Mombaza (*Panicum maximum* Jacq.). This species was introduced in America in 1967, it presents high forage production (33 t MS.ha⁻¹.year⁻¹) and leaf-stem ratio, good nutritional quality, fast recovery after grazing and tolerance to high content of temporary moisture in the soil (Jank, 1995).

The majority of producers in the area turn to mineral fertilization, which is expensive and highly polluting for environment, however, in various bovine production systems in this province it has been observed that yield and quality of the pasture are medium to low, due to the lack of techniques that favor the development of the plant, among which are shading, bioregulators and biostimulants. In this sense, Plana *et al.* (2016)

sombreado, los biorreguladores y los bioestimulantes. En este sentido, Plana *et al.* (2016) señalaron que es posible obtener los mismos resultados de la fertilización química, con menores costos de producción, a través del uso de biofertilizantes que en algunos casos son bioestimulantes o biorreguladores.

El sombreado de los pastos modifica la morfoestructura, mejora la cantidad, la calidad y la digestibilidad del pasto o forraje, y consiguientemente, la ganancia diaria de peso del animal (Obispo *et al.*, 2008; 2013; Encinozo *et al.*, 2017). Entre otros beneficios de la inclusión de árboles y/o arbustos en los potreros -base de los sistemas silvopastoriles y agroforestales- se encuentran: el aporte de forraje, el aumento del bienestar animal ya que disminuye el estrés calórico (Ramírez *et al.*, 2017) e incrementa el consumo del animal y el contenido de materia orgánica en el suelo (Encinozo *et al.*, 2017). Además, contribuyen a la mitigación del cambio climático en la ganadería tropical (Milera, 2013).

Por tanto, los sistemas agroforestales ofrecen beneficios ecológicos y económicos, por los ingresos o productos que se generan del sistema multipropósito animal-pasto-árbol. Es por ello, que algunos productores de la provincia Santo Domingo de los Tsáchilas han diversificado su sistema de producción de naranja Valencia (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) con el pasto Mombaza y la cría de ganado vacuno. Según el INEC (2019), la provincia tiene una superficie plantada de naranjo de 21 ha en monocultivo y 463 ha en asociación.

pointed out that it is possible to obtain the same results from chemical fertilization, with lower production costs, through the use of biofertilizers, which in some cases are biostimulants or bioregulators.

Pasture shading modifies the morphostructure, improves the quantity, quality and digestibility of the pasture or forage, and consequently, the animal daily weight gain (Obispo *et al.*, 2008; 2013; Encinozo *et al.*, 2017). Among other benefits of the inclusion of trees and/or shrubs in pastures -basis of silvopastoral and agroforestry systems- are: the contribution of forage, the increase in animal welfare since it reduces heat stress (Ramírez *et al.*, 2017) and increases the animal's intake and the content of organic matter in the soil (Encinozo *et al.*, 2017). In addition, they contribute to the mitigation of climate change in tropical livestock (Milera, 2013).

Therefore, agroforestry systems offer ecological and economic benefits, due to the income or products that are generated from the multipurpose animal-pasture-tree system. That is why some producers in the Santo Domingo de los Tsáchilas province have diversified their Valencia orange production system (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) with Mombaza grass and cattle raising. According to the INEC (2019), the province has an orange tree planted area of 21 ha in monoculture and 463 ha in association.

On the other hand, bioregulators are made up of phytohormones and/or developmental regulators, responsible for the gene expression patterns of

Por otra parte, los biorreguladores están conformados por fitohormonas y/o reguladores del desarrollo, responsables de los patrones de expresión génica de diversos eventos del desarrollo vegetal (Taiz *et al.*, 2015); entre los más usados están las auxinas, las citocininas y las giberelinas. No obstante, un bioestimulante es cualquier sustancia y/o microorganismo que mejora la absorción y la asimilación de los nutrientes, la tolerancia al estrés biótico o abiótico, y las características morfoagronómicas. Los bioestimulantes pueden contener varias sustancias dependiendo del material origen, entre ellas: fitohormonas, aminoácidos, péptidos, vitaminas, enzimas, minerales, ácidos húmicos y fúlvicos, extractos de algas y plantas, biopolímeros (quitosanos), compuestos inorgánicos, hongos y bacterias benéficas (Du Jardin, 2015).

Se han reportado los beneficios de dichos productos en cuanto al establecimiento del cultivo, características morfoestructurales (Rocha *et al.*, 2019), producción y calidad del pasto (Oliveira *et al.*, 2019; Aguilar *et al.*, 2020) y las concentraciones de N, P y K, y de bioproductos (biofertilizantes y hongos micorrízicos arbusculares) en la biomasa aérea del forraje (Plana *et al.*, 2016). Sin embargo, en Mombaza se requieren estudios sobre este tipo de técnicas. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del sombreado, biorreguladores y bioestimulante en el desarrollo y el rendimiento del pasto Mombaza.

various events of plant development (Taiz *et al.*, 2015); among the most used are auxins, cytokinins and gibberellins. However, a biostimulant is any substance and/or microorganism that improves the absorption and assimilation of nutrients, tolerance to biotic or abiotic stress, and morphoagronomic characteristics. Biostimulants can contain various substances depending on the source material, including: phytohormones, amino acids, peptides, vitamins, enzymes, minerals, humic and fulvic acids, algae and plant extracts, biopolymers (chitosans), inorganic compounds, fungi and beneficial bacteria (Du Jardin, 2015).

The benefits of these products have been reported in terms of crop establishment, morphostructural characteristics (Rocha *et al.*, 2019), production and quality of the pasture (Oliveira *et al.*, 2019; Aguilar *et al.*, 2020) and concentrations of N, P and K, and of bioproducts (biofertilizers and arbuscular mycorrhizal fungi) in the aerial biomass of the forage (Plana *et al.*, 2016). However, Mombaza requires studies on this type of technique. For this reason, the objective of this work was to evaluate the effect of shading, bioregulators and biostimulant on the development and performance of Mombaza grass.

Materials and methods

Study zone

The experiment was carried out in the period between October 12, 2018 and February 27, 2019, in “La Maravilla” farm, UTM coordinates

Materiales y Métodos

Zona de estudio

El experimento se realizó en el lapso comprendido entre el 12 de octubre del 2018 y el 27 de febrero del 2019, en la finca “La Maravilla”, coordenadas UTM X=775290, Y=9980960 y Z=513, ubicada en el recinto Praderas del Toachi, cantón Santo Domingo, provincia Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. La unidad de producción se encuentra en una zona lluviosa tropical con promedios anuales de temperatura de 24,5 °C, humedad relativa de 88 %, precipitación de 3372 mm (figura 1) y heliofanía de 761 horas de brillo solar (INAMHI, 2019).

X=775290, Y=9980960 and Z=513, located in the Praderas del Toachi enclosure, canton of Santo Domingo, Santo Domingo de los Tsáchilas province, Ecuador. The production unit is located in a tropical rainy zone with annual averages of temperature of 24.5 °C, relative humidity of 88 %, precipitation of 3372 mm (figure 1) and heliophany of 761 hours of solar brightness (INAMHI, 2019).

Precipitation is distributed in two periods: the first one, with greater precipitation from December to May (262-523 mm.month⁻¹) and another with less precipitation from June to November (89 to 186 mm.month⁻¹) (Figure 1) (MAG, 2019; INAMHI, 2019), known in the area as dry and rainy periods, respectively.

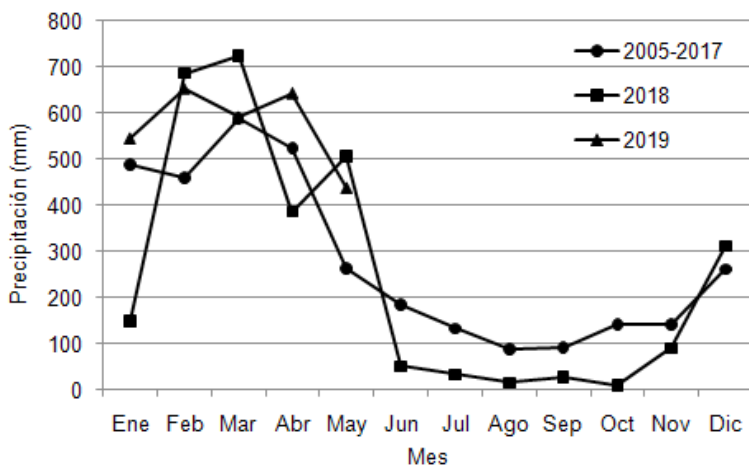


Figura 1. Precipitación mensual de la provincia Santo Domingo de los Tsáchilas.

Figure 1. Monthly rainfall of the province Santo Domingo de los Tsáchilas.

La precipitación se distribuye en dos períodos: uno de mayor precipitación de diciembre a mayo (262-523 mm.mes⁻¹) y otro de menor precipitación de junio a noviembre (89 a 186 mm.mes⁻¹) (figura 1) (MAG, 2019; INAMHI, 2019), denominados en la zona como periodo seco y lluvioso, respectivamente.

Material vegetal. Se utilizó pasto Mombaza (*Panicum maximum*), de 300 días de edad, con una densidad de 9 plantas.m⁻², cultivado en un suelo profundo oscuro del orden Andisol, de textura franco arenosa con arcilla tipo alófana, ligeramente ácido, no salino y con alto contenido de materia orgánica (cuadro 1).

Vegetal material. Mombaza grass (*Panicum maximum*) was used, 300 days old, with a density of 9 plants.m⁻², cultivated in a deep dark soil of the Andisol order, with a sandy loam texture with allophane-type clay, slightly acidic, not saline. and with a high content of organic matter (table 1).

Experimental design

A completely randomized block design with an split plot arrangement of treatments and three replications, was used. In the main plot, the shade study factor was located with two levels, S1: full sun exposure, no shade; and S2: shade (60 %) of Valencia orange trees (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), eight years old

Cuadro 1. Análisis de suelo.

Table 1. Soil analysis.

Parámetro	Valor	Descripción	Parámetro	Valor	Descripción
				ppm	
pH	6,17		Zn	20,80	Alto
Conductividad eléctrica	0,19 ds.m ⁻²		Mn	13	Medio
Materia orgánica	6,6%	Alto		meq.100 g ⁻¹	
NH4	49	Alto	K	0,21	Medio
P	8,02	Medio	Ca	4	Bajo
S	6,72	Medio	Mg	1,01	Bajo
Cu	5,80	Alto	Ca/Mg	3,96	Óptimo
B	0,53	Alto	Mg/K	4,81	Óptimo
Fe	167,6	Alto	(Ca+Mg)/k	23,86	Óptimo

Profundidad a 20 cm.

Depth at 20 cm.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con arreglo de tratamientos en parcelas divididas, con

with a separation between plants and rows of 7 m. In the secondary plot, the application of commercial bioregulators and biostimulants

tres repeticiones. En la parcela principal se ubicó el factor de estudio sombra con dos niveles, S_1 : plena exposición solar, sin sombra; y S_2 : sombra (60 %) de árboles de naranja Valencia (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), de ocho años de edad con una separación entre plantas e hileras de 7 m. En la parcela secundaria, la aplicación de productos comerciales biorreguladores y bioestimulantes con cuatro niveles, A_0 : testigo, sin aplicación de productos; A_1 : dosis mínima de biorreguladores: Cytokinin + New Gibb 10 %, A_2 : dosis máxima de biorreguladores y A_3 : dosis comercial de bioestimulante Algamar (cuadro 2) para un total de ocho tratamientos.

with four levels, A_0 : control, without application of products; A_1 : minimum dose of bioregulators: Cytokinin + New Gibb 10 %, A_2 : maximum dose of bioregulators and A_3 : commercial dose of Algamar biostimulant (Table 2) for a total of eight treatments.

Each treatment consisted of a 9 m² plot (3 m x 3 m) with 1 m separation between plots, and the experimental unit by a 0.5 m x 0.5 m grid. To determine the percentage of shade, it was measured at noon (12:00 m.) And the vertical projection of the tree canopy (area in m²) on the soil surface cultivated with grass was considered (Alonso *et al.*, 2006).

Cuadro 2. Descripción de productos biorreguladores y bioestimulante.

Table 2. Description of bioregulatory and biostimulant products.

		Nombre comercial	Ingrediente activo	Dosis.ha ⁻¹
A_0 :	Testigo	-	-	-
A_1 :	Dosis mínima de biorreguladores	Cytokinin	Kinetina (0,01 %)	250 mL
		New Gibb 10 %	Ácido giberélico (10 %)	10 g
A_2 :	Dosis máxima de biorreguladores	Cytokinin	Kinetina (0,01 %)	500 mL
		New Gibb 10 %	Ácido giberélico (10 %)	20 g
A_3 :	Bioestimulante	Algamar*	Materia orgánica algacea (82,54 %) y otros compuestos (17,46 %)	750 g

*Algas marinas (*Ascophyllum nodosum*, *Sargassum*, *Laminaria*, *Macrocystis pyrifera*, *Egrecia menziesii*), ácido alginico (5 %), N (3 %), K (5,3 %), P (0,1 %), Ca (0,4 %), S (3,5 %), Mg (0,15 %), Cu (2 mg.kg⁻¹), Fe (25 mg.kg⁻¹), B (30 mg.kg⁻¹), betaínas (3 mg.kg⁻¹) y promotores del crecimiento naturales (400 mg.kg⁻¹).

*Seaweed (*Ascophyllum nodosum*, *Sargassum*, *Laminaria*, *Macrocystis pyrifera*, *Egrecia menziesii*), alginic acid (5 %), N (3 %), K (5.3 %), P (0.1 %), Ca (0.4 %), S (3.5 %), Mg (0.15 %), Cu (2 mg.kg⁻¹), Fe (25 mg.kg⁻¹), B (30 mg.kg⁻¹), betaines (3 mg.kg⁻¹) and natural growth promoters (400 mg.kg⁻¹).

Cada tratamiento estuvo conformado por una parcela de 9 m² (3 m x 3 m) con separación entre parcelas de 1 m, y la unidad experimental por

Crop management and grass cutting

Initially, a uniform cut was made to the grass, at 10 cm above the

una cuadrícula de 0,5 m x 0,5 m. Para determinar el porcentaje de sombra, se midió al mediodía (12:00 m.) y se consideró la proyección vertical de la copa de los árboles (área en m²) sobre la superficie de suelo cultivada con pasto (Alonso *et al.*, 2006).

Manejo de cultivos y corte del pasto

Inicialmente, se realizó un corte de uniformidad al pasto, a 10 cm de altura del suelo con una motoguadaña (marca Sthil modelo FS-450); al siguiente día se realizó la aplicación de biorreguladores y bioestimulante, con la ayuda de una asperjadora de espalda manual de 20 L de capacidad; posteriormente a los tres días se aplicó el fertilizante a razón de 200 kg.ha⁻¹ de Yaramila Complex (12-11-18-3) y a los 35 días después del corte de uniformidad se realizó el primer corte del pasto (cuadro 3). Posteriormente, se realizaron dos cortes, donde el cultivo se manejó de la misma forma que en el primer corte. El control de arvenses se realizó mecánicamente (machete) a los 20 días del segundo corte. Los cortes 1 y 2 se ubicaron en el periodo de mínima precipitación, y el corte 3 en el de mayor precipitación. La precipitación durante el experimento y en los tres cortes del pasto se muestra en la figura 1 y el cuadro 3 (INAMHI, 2019).

En cuanto al cultivo del naranjo, al inicio del experimento se fertilizó con Yaramila Complex a razón de 100 g.planta⁻¹, colocada en la periferia de la proyección de la copa; se le realizó una poda de mantenimiento (fitosanitaria con ayuda de tijeras) cada dos meses y control de arvenses, mecánicamente, una vez al mes. Ambos cultivos se mantuvieron bajo condiciones de secano.

ground with a motor trimmer (Sthil brand model FS-450); On the next day, the application of bioregulators and biostimulant was carried out, with the help of a manual back sprayer of 20 L capacity; After three days, the fertilizer was applied at a rate of 200 kg.ha⁻¹ of Yaramila Complex (12-11-18-3) and 35 days after the uniformity cut, the first grass cut was made (Table 3) . Subsequently, two cuts were made, where the culture was managed in the same way as in the first cut. The weed control was performed mechanically (machete) 20 days after the second cut. Cuts 1 and 2 were located in the period of minimum rainfall, and cut 3 in the one with the highest rainfall. The precipitation during the experiment and in the three grass cuts is shown in figure 1 and table 3 (INAMHI, 2019).

Regarding the orange tree plantation, at the beginning of the experiment it was fertilized with Yaramila Complex at a rate of 100 g.plant⁻¹, placed on the periphery of the projection of the crown; a maintenance pruning (phytosanitary with the help of scissors) was carried out every two months and weed control, mechanically, once a month. Both crops were kept under dry conditions.

Study variables

In each grass cut, two squares of 0.5 m x 0.5 m were randomly thrown in each treatment, in which the variables were evaluated: tiller height (AM), number of tillers.m⁻² (NMM), number of stems.tillers⁻¹ (NTM) and DM yield (RMS) (kg.m⁻²). AM was measured with a measuring tape from

Cuadro 3. Precipitación durante el experimento.**Table 3. Precipitation during the experiment.**

Corte	Intervalo	Días	Nº de días ≥ 1 mm	Precipitación (mm)		Acumulada
				Mínima – Máxima diaria	Total por intervalo	
1	12/10/18 - 15/11/18	35	8	0,1 - 21	42,6	42,6
	16/11/18 - 21/11/18	6	4	1,5 - 18,9	24,4	67,0
2	22/11/18 - 26/12/18	35	20	0,2 - 42,4	275,7	342,7
	27/12/18 - 23/01/19	28	22	0,6 - 107	502,2	844,9
3	24/01/19 - 27/02/19	35	27	0,3 - 89,6	759,3	1064,2
Total		139	81		1604,2	

Variables de estudio

En cada corte del pasto, se lanzaron al azar dos cuadrículas de 0,5 m x 0,5 m en cada tratamiento, en las que se evaluaron las variables: altura de macolla (AM), número de macollas.m⁻² (NMM), número de tallos.macolla⁻¹ (NTM) y rendimiento de MS (RMS) (kg.m⁻²). AM se midió con una cinta métrica desde la base hasta el ápice de uno de los tallos de la parte central de la macolla; NMM y NTM mediante el conteo de las macollas presentes por metro cuadrado y de los tallos en cada macolla, respectivamente. RMS se determinó a través del secado de 1 kg, por unidad experimental de biomasa de la parte aérea de la macolla (hojas y tallos) en una estufa a 70 °C durante 72 horas.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza mediante GLM del software InfoStat versión libre (Universidad Nacional de Córdoba, versión 2014). Cuando los factores de estudio mostraron efectos significativos se utilizó la prueba de Tukey para la comparación de medias.

the base to the apex of one of the stems in the central part of the clump; NMM and NTM by counting the clusters present per square meter and the stems in each cluster, respectively. RMS was determined by drying 1 kg, per experimental unit of biomass of the aerial part of the tiller (leaves and stems) in an oven at 70 °C for 72 hours.

Statistical analysis

An analysis of variance was performed using GLM of the free version InfoStat software (Universidad Nacional de Córdoba, version 2014). When the study factors showed significant effects, the Tukey test was used to compare means.

Results and discussion

The analysis of variance did not show significant effects (p>0.05) of the interactions between shading and the application of bioregulators and biostimulant on the variables under study in the three sections evaluated.

Resultados y discusión

El análisis de varianza no mostró efectos significativos ($p > 0,05$) de las interacciones entre el sombreado y la aplicación de biorreguladores y bioestimulante sobre las variables en estudio en los tres cortes evaluados.

En el primer corte del pasto, la condición de sombreado mostró efecto significativo ($p \leq 0,05$) sobre el desarrollo y el rendimiento de Mombaza; en las cuatro variables de estudio (cuadro 4). La altura de macolla, el número de tallos por macolla y el rendimiento de MS alcanzaron los mayores valores cuando el pasto se cultivó a plena exposición solar; mientras que el número de macollas.m⁻² se vio favorecido con la sombra. Para el segundo y el tercer corte, el factor sombreado también afectó las cuatro variables evaluadas que mostraron el mismo comportamiento del primer corte.

Los resultados de altura macolla, número de tallos.macolla⁻¹ y rendimiento de MS tienen similitud con lo reportado por Navarro y Corpas (2012) para Mombaza (en Sucre, Colombia) donde las plantas a plena exposición solar mostraron mayor desarrollo en cuanto a altura de planta, número de tallos.planta⁻¹ y MS. También se corresponden con la investigación de Encinozo *et al.* (2017), quienes lograron mayor altura y MS cuando el estrato herbáceo estuvo a plena exposición solar, respuesta que asociaron a la producción de biomasa y disponibilidad. Los resultados obtenidos en Mombaza se deben a que las plantas a plena exposición solar

In the first grass cut, the shading condition showed a significant effect ($p \leq 0.05$) on the development and performance of Mombaza; in the four study variables (Table 4). The tiller height, the number of stems per tiller and the DM yield reached the highest values when the grass was cultivated under full sun exposure; while the number of tillers per square meter was favored with the shade. For the second and third cut, the shaded factor also affected the four variables evaluated that showed the same behavior as the first cut.

The results of tiller height, number of stems per tiller and DM yield are similar to that reported by Navarro and Corpas (2012) for Mombaza (in Sucre, Colombia) where plants under full sun exposure showed greater development in terms of plant height, number of stems per plant and DM. They also correspond to the research of Encinozo *et al.* (2017), who achieved greater height and DM when the herbaceous stratum was under full sun exposure, a response that they associated with biomass production and availability. The results obtained in Mombaza are due to the fact that plants with full solar exposure have a greater source of energy, heat or information for photosynthesis, the synthesis and accumulation of carbohydrates is favored, and with them, the growth rate and the production of biomass (Taiz *et al.*, 2015).

The light attenuation by shading has the capacity to cause positive or negative changes in the morphostructural and physiological characteristics (Blanco *et al.*, 2015),

tienen mayor fuente de energía, calor o información para la fotosíntesis, se favorece la síntesis y la acumulación de carbohidratos, y con ellos, la tasa de crecimiento y la producción de biomasa (Taiz *et al.*, 2015).

La atenuación lumínica por sombreado tiene la capacidad de ocasionar cambios positivos o negativos en las características morfoestructurales y fisiológicas (Blanco *et al.*, 2015), tales como: altura, perímetro de la macolla, número de hijos por planta, ancho de la hoja, número de tallos y macollas por planta, altura de rebrote, MS (Alonso *et al.*, 2006; Navarro *et al.* 2012; Encinozo *et al.*, 2017), área foliar, índice de área foliar, tasa de asimilación de CO₂, alargamiento del tallo, entre otros (Navarro *et al.* 2012; Azcón y Talón, 2013; Taiz *et al.*, 2015). Además, en los pastos se han señalado incrementos en el contenido de nitrógeno y en la digestibilidad de la MS (Araujo, 2014).

Referente al mayor número de macollas por metro cuadrado obtenido a plena exposición solar, en los tres cortes (cuadro 4), no se corresponden con otras investigaciones; Navarro y Corpas (2012) registraron mayor cantidad de macollas por planta cuando la Mombaza se cultivó a plena exposición solar. Por otra parte, en el pasto Dallis (*Brachiaria decumbens* Stapf) se obtuvo que los tratamientos con sombreado (30 y 50 %) y a plena exposición solar no afectaron el número de plantas por metro cuadrado, debido a la tolerancia de este pasto a la sombra (Carrilho *et al.*, 2012). El menor

such as: height, tiller perimeter, number of shoots per plant, width of the plant leaf, number of stems and tillers per plant, regrowth height, DM (Alonso *et al.*, 2006; Navarro *et al.* 2012; Encinozo *et al.*, 2017), leaf area, leaf area index, assimilation rate of CO₂, stem elongation, among others (Navarro *et al.* 2012; Azcón and Talón, 2013; Taiz *et al.*, 2015). In addition, increases in nitrogen content and DM digestibility have been reported in pastures (Araujo, 2014).

Regarding the highest number of tillers m⁻² obtained with full sun exposure, in the three cuts (table 4), they do not correspond to other investigations; Navarro and Corpas (2012) recorded a higher number of tillers. Plant-1 when the Mombaza was grown under full sun exposure. On the other hand, in the Dallis grass (*Brachiaria decumbens* Stapf) it was obtained that the treatments with shading (30 and 50 %) and full solar exposure did not affect the number of plants per square meter, due to the tolerance of this grass to the shadow (Carrilho *et al.*, 2012). The lower number of tillers per square meter observed in Mombaza at full sun exposure is attributed to a way of compensation in the development of the plant due to the higher light incidence (Taiz *et al.*, 2015), since the grass in this condition reached higher height, number of stems per tiller and DM yield (table 4).

The DM yields obtained in the three cuts of the grass grown under full sun exposure, equivalent to 1.8; 3 and 4 t.ha⁻¹, are higher than the value registered for Mombaza by Navarro

número de macollas.m⁻² observado en Mombaza a plena exposición solar, se atribuye a una forma de compensación en el desarrollo de la planta por la mayor incidencia lumínica (Taiz *et al.*, 2015), dado que el pasto en dicha condición alcanzó mayor altura, número de tallos por macolla y rendimiento de MS (cuadro 4).

and Corpas (2012), who reported 1 t.ha⁻¹ of DM at 35 days. The values of the three cuts also differed from those indicated by Ramírez *et al.* (2009) and Velasco *et al.* (2018) of: 5 and 6 t.ha⁻¹ of DM approximately, at 30 and 40 days, respectively. These differences were attributed to the experimental edaphoclimatic and management conditions.

Cuadro 4. Efecto del sombreado en el desarrollo y el rendimiento de materia seca (RMS) del pasto Mombaza, en los tres cortes del pasto.

Table 4. Effect of shading on the development and dry matter yield (MSY) of Mombaza grass, in the three grass cuts.

Condición de sombreado	Altura de macolla (cm)	Número de macollas.m ⁻²	Número de tallos. macolla ⁻¹	RMS (kg.m ⁻²)
Corte 1*				
Exposición solar	86,77 ^a	11,00 ^b	21,51 ^a	0,180 ^a
Sombra	68,71 ^b	12,00 ^a	11,99 ^b	0,078 ^b
Corte 2*				
Exposición solar	90,88 ^a	10,17 ^b	23,99 ^a	0,300 ^a
Sombra	74,46 ^b	13,33 ^a	9,42 ^b	0,085 ^b
Corte 3**				
Exposición solar	116,15 ^a	9,83 ^b	18,88 ^a	0,398 ^a
Sombra	80,60 ^b	11,67 ^a	5,97 ^b	0,059 ^b

^{a, b}Medias con letras diferentes en la misma columna dentro de cada corte presentan diferencias según prueba de Tukey (p≤0,05). *Periodo de mínima precipitación. **Periodo de mayor precipitación.

^{a, b}Means with different letters in the same column within each cut-off show differences according to Tukey's test (p ≤0.05). *Period of minimum precipitation. ** Period of highest precipitation.

Los rendimientos de MS obtenidos en los tres cortes del pasto cultivado a plena exposición solar, equivalentes a 1,8; 3 y 4 t.ha⁻¹, son superiores al valor registrado para Mombaza por Navarro y Corpas (2012), quienes

On the other hand, DM yield in cuts 2 and 3 showed 66.67 and 121 % more DM than cut 1, which may be related to a higher development of the pasture influenced by age and environmental conditions. Regarding

reportaron 1 t.ha⁻¹ de MS a los 35 días. Los valores, de los tres cortes, también difirieron de los indicados por Ramírez *et al.* (2009) y Velasco *et al.* (2018) de: 5 y 6 t.ha⁻¹ de MS aproximadamente, a los 30 y 40 días, respectivamente. Estas diferencias se atribuyeron a las condiciones experimentales edafoclimáticas y de manejo.

Por otra parte, el rendimiento de MS en los cortes 2 y 3 mostraron 66,67 y 121 % más de MS que el corte 1, lo cual puede relacionarse a un mayor desarrollo del pasto influenciado por la edad y las condiciones ambientales. En cuanto a este último factor, los cortes 2 y 3 tuvieron mayor precipitación, 275,7 y 759,3 mm por intervalo (cuadro 3) respectivamente, por ende, mayor disponibilidad de agua en el suelo para el desarrollo de la planta, cultivada en secano. De igual manera, la respuesta se asoció con la capacidad de producción de biomasa de la planta, la cual está determinada por la radiación fotosintéticamente activa absorbida (Blanco *et al.*, 2015; Taiz *et al.*, 2015) y la genética o eficiencia de conversión a MS. Con respecto al corte 1, la precipitación fue baja (42,6 mm) y éste tuvo cinco meses previos con 10 a 50 mm mensuales aproximadamente, ubicado hacia el final del periodo de menor precipitación (cuadro 3, figura 1), lo que refleja el requerimiento de riego complementario en ese intervalo de tiempo.

El sombreado redujo notablemente el rendimiento de MS del pasto Mombaza en 56,67, 71,67 y 85,18 % en los cortes 1, 2 y 3, respectivamente (cuadro 4), lo que sugiere considerar otros niveles de sombreado menores

this last factor, cuts 2 and 3 had higher precipitation, 275.7 and 759.3 mm per interval (table 3) respectively, therefore, greater availability of water in the soil for plant development cultivated in dry land. Similarly, the response was associated with the plant's biomass production capacity, which is determined by absorbed photosynthetically active radiation (Blanco *et al.*, 2015; Taiz *et al.*, 2015) and the genetics or efficiency of conversion to MS. Regarding cut 1, precipitation was low (42.6 mm) and this had five previous months with approximately 10 to 50 mm per month, located towards the end of the period of less precipitation (table 3, figure 1), which reflects the supplemental irrigation requirement in that time interval.

Shading notably reduced the DM yield of Mombaza grass by 56.67, 71.67 and 85.18 % in cuts 1, 2 and 3, respectively (table 4), which suggests considering other levels of shading lower than 60 %, given that the density of the orange tree -sowing distance of 7 m x 7 m- had a negative influence on the Mombaza grass, as well as on the economic benefits of the production system. For this type of agroforestry system with established orange trees, it would be convenient to distribute -or use- the trees mainly towards the pasture surroundings, or else, the use of a plantation frame greater than 7 m x 7 m (possible thinning of some trees), since it was not beneficial to use all the trees with that separation. With a lower tree density, there is more space and better distribution of solar radiation (Matheus and Ordus, 2016)

al 60 %, dado que la densidad del naranjo -distancia de siembra de 7 m x 7 m influyó negativamente en el pasto Mombaza, así como, en los beneficios económicos del sistema de producción. Para este tipo de sistema agroforestal con naranjos establecidos, sería conveniente la distribución -o el aprovechamiento- de los árboles principalmente hacia el entorno de los potreros, o bien, el empleo de un marco de plantación superior al de 7 m x 7 m (posible raleo de algunos árboles), ya que no resultó beneficioso utilizar todos los árboles con esa separación. Con una densidad de árboles menor, se dispone de más espacio y mejor distribución de la radiación solar (Matheus y Ordus, 2016) para el desarrollo y la producción del pasto.

Aunque, la respuesta del pasto depende de varios factores, como la interacción árbol-gramínea (Alonso *et al.*, 2006) y las condiciones agroecológicas, ésta se ha relacionado con la cantidad y la calidad de luz (Blanco *et al.*, 2015), y el grado de tolerancia de la planta a la sombra. Esto en virtud de que el sombreado por plantas vecinas modifica el ambiente lumínico (mayor cantidad de luz roja lejana, 700 a 800 nm), en el cual se reduce la radiación fotosintéticamente activa (400 a 700 nm), y en consecuencia ocurren proporciones reducidas de Pfr (forma interfotocconvertible de los fitocromos activa que tiene su máximo de absorción en el rojo lejano, 730 nm) debidas a bajas relaciones Rojo: Rojo Lejano (R:RL), condición que disminuye los procesos fisiológicos; la luz roja lejana tiene un efecto inhibitorio y la roja activador (Azcón y

for the development and production of grass.

Although, the response of the pasture depends on several factors, such as the tree-grass interaction (Alonso *et al.*, 2006) and the agroecological conditions, it has been related to the quantity and quality of light (Blanco *et al.*, 2015), and the degree of tolerance of the plant to the shade. This is due to the fact that the shading by neighboring plants modifies the light environment (greater amount of far red light, 700 to 800 nm), in which photosynthetically active radiation is reduced (400 to 700 nm), and consequently reduced proportions occur of Pfr (interphotoconvertible form of active phytochromes that has its maximum absorption in the far red, 730 nm) due to low Red: Far Red (R:RL) ratios, a condition that reduces physiological processes; distant red light has an inhibitory effect and red light has an activating effect (Azcón and Talón, 2013; Blanco *et al.*, 2015; Taiz *et al.*, 2015).

It was observed that Mombaza was not very tolerant to the shade level of 60 % in the evaluated periods, this behavior is similar to other works carried out in Guinea grass (*P. maximum* Jacq.). In which higher DM yields were obtained when the grass was grown under full sun exposure or with a level of shade close to 10 % (Obispo *et al.*, 2008), with 5 % and 22.5 % (Obispo *et al.*, 2013), from Samán trees (*Samanea saman* (Jacq) Merr). Although, in another investigation with Guinea associated with *Leucaena* (*Leucaena leucocephala* (Lam.) De

Talón, 2013; Blanco *et al.*, 2015; Taiz *et al.*, 2015).

Se observó que Mombaza fue poco tolerante al nivel de sombra de 60% en los períodos evaluados, este comportamiento tiene semejanza con otros trabajos realizados en pasto Guinea (*P. maximum* Jacq.), en los que se obtuvieron mayores rendimientos de MS cuando el pasto se cultivó a plena exposición solar o con un nivel de sombra cercano al 10 % (Obispo *et al.*, 2008), con 5 % y 22,5 % (Obispo *et al.*, 2013), proveniente de árboles de Samán (*Samanea saman* (Jacq) Merr). Aunque, en otra investigación con Guinea asociada con Leucaena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit), la condición de sombreado (42 a 56,75 % de sombra y plena exposición solar) no influyó en el rendimiento de MS, la altura de planta y el número de hijos.planta⁻¹, a los 4, 5 y 6 años de edad (Alonso *et al.*, 2006).

Según Obispo *et al.* (2008; 2013), la MS disminuye bajo sombra, pero la calidad del pasto mejora notablemente; en Guinea, los contenidos de proteína cruda fueron similares en todos los niveles de sombra, con tendencia numérica a ser mayor con el incremento del nivel de sombreado; y la digestibilidad mayor en las áreas con alto (>30 %) y medio nivel de sombra (20-30 %). En pastizales de guinea (70 %) con estrella (*Cynodon nlemfuensis* Vandyerst) (28 %), el sombreado también mejoró su calidad a través de cambios en los contenidos de proteína, disminución de las estructuras fibrosas, mayor digestibilidad y ganancia de peso de los animales (Obispo *et al.*, 2013).

Wit), the shading condition (42 to 56.75 % shade and full sun exposure) did not influence the DM yield, the height of plant and the number of shoots.plant⁻¹, at 4, 5 and 6 years of age (Alonso *et al.*, 2006).

According to Obispo *et al.* (2008; 2013), the DM decreases under shade, but the quality of the pasture improves notably; in Guinea, the crude protein contents were similar at all levels of shade, with a numerical tendency to be higher with increasing level of shading; and the highest digestibility in areas with high (> 30 %) and medium level of shade (20-30 %). In guinea grasslands (70 %) with star-grass (*Cynodon nlemfuensis* Vandyerst) (28%), shading also improved its quality through changes in protein content, reduction of fibrous structures, greater digestibility and weight gain of the animals (Obispo *et al.*, 2013).

On the other hand, the application of bioregulatory and biostimulant products had a significant influence (P<0.005) only in the tiller height in cut 1 (Table 5). The highest height was achieved when the minimum and maximum doses of bioregulators (Cytokine + New Gibb 10 %), and the biostimulant (Algamar) were applied, treatments that were statistically similar, so it is appropriate to use the minimum dose of bioregulators (250 mL.ha⁻¹ of Cytokine + 10 g.ha⁻¹ of New Gibb 10 %) because it would generate a lower production cost. On the other hand, the biostimulant and the control showed the same response.

The minimum dose of bioregulators allowed the highest tiller height, which

Porotrolado, la aplicación de productos biorreguladores y bioestimulante influyó significativamente ($p < 0,005$) solo en la altura de macolla en el corte 1 (cuadro 5). La mayor altura se logró cuando se aplicaron las dosis mínima y máxima de biorreguladores (Cytokin + New Gibb 10 %), y el bioestimulante (Algamar), tratamientos que fueron estadísticamente similares, por lo que resulta propicio utilizar la dosis mínima de biorreguladores (250 mL.ha⁻¹ de Cytokin + 10 g.ha⁻¹ de New Gibb 10 %) porque generaría menor costo de producción. Por otra parte, el bioestimulante y el testigo mostraron igual respuesta.

showed that at this dose the Mombaza grass was more sensitive. This is because the response or hormonal action depends on the variation in the concentration of the hormone and the sensitivity of the tissues or organs to it; the latter influenced by age, environmental conditions (Azcón and Talón, 2013), species and genotype (Mora, 2013; Guilcapi *et al.*, 2019).

Bioregulators contain phytohormones or development regulators in their composition, and biostimulants a smaller amount, so the former have a greater influence on the sprouting of the apices or meristematic points and, consequently, the

Cuadro 5. Efecto de la aplicación de productos biorreguladores y bioestimulante en la altura de macolla del pasto Mombaza en el corte 1.

Table 5. Effect of the application of bioregulatory and biostimulant products on the tiller height of Mombaza grass in cut 1.

Producto	Altura de macolla (cm)
Testigo	65,17 ^b
Dosis mínima de biorreguladores: 250 mL.ha ⁻¹ Cytokin + 10 g.ha ⁻¹ New Gibb 10%	87,71 ^a
Dosis máxima de biorreguladores: 500 mL.ha ⁻¹ Cytokin + 20 g.ha ⁻¹ New Gibb 10%	86,54 ^a
Bioestimulante: 750 g.ha ⁻¹ Algamar	71,54 ^{ab}

Medias con letras diferentes presentan diferencias según prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Means with different letters show differences according to Tukey's test ($p \leq 0.05$).

La dosis mínima de biorreguladores permitió la mayor altura de macolla, lo que mostró que a dicha dosis el pasto Mombaza fue más sensible. Esto debido a que la respuesta o acción hormonal depende de la variación de la concentración de la hormona y de la sensibilidad de los tejidos u órganos

development of leaves, stems and roots. In this sense, the response observed in the present investigation, greater tiller height with the application of bioregulators, was associated with the effect of the combination of cytokinins and gibberellins in the product (Azcón and Talón, 2013).

frente a ésta; esta última influenciada por la edad, las condiciones ambientales (Azcón y Talón, 2013), la especie y el genotipo (Mora, 2013; Guilcapi *et al.*, 2019).

Los biorreguladores contienen en su composición fitohormonas o reguladores del desarrollo, y los bioestimulantes menor cantidad, por lo que los primeros tienen mayor influencia en la brotación de los ápices o puntos meristemáticos y, consecuentemente, el desarrollo de hojas, tallos y raíces. En este sentido, la respuesta observada en la presente investigación, mayor altura de macolla con la aplicación de biorreguladores, se asoció al efecto de la combinación de citocininas y giberelinas del producto (Azcón y Talón, 2013).

Lo anterior debido a que las citocininas promueven la división celular, el crecimiento (división celular + alargamiento celular), la ruptura de la dominancia apical (proliferación y brotación de yemas laterales), la formación y actividad de los puntos meristemáticos (nuevos tejidos), la diferenciación celular, el desarrollo de cloroplastos; retrasan la caída de las hojas (senescencia foliar) y participan en la movilización de nutrientes desde las hojas a otras partes de la planta. Mientras que las giberelinas favorecen el alargamiento celular (principalmente) y la división celular, por ende, producen efectos pleiotrópicos, entre los que destaca el alargamiento del tallo (Azcón y Talón, 2013; Taiz *et al.*, 2015).

Al respecto, se ha reportado que la citocinina bencilaminopurina promovió el crecimiento, la

This is due to the fact that cytokinins promote cell division, growth (cell division + cell elongation), the breakdown of apical dominance (proliferation and sprouting of lateral buds), the formation and activity of meristematic points (new tissues), cell differentiation, the development of chloroplasts; they delay the fall of the leaves (foliar senescence) and participate in the mobilization of nutrients from the leaves to other parts of the plant. While gibberellins favor cell elongation (mainly) and cell division, therefore, they produce pleiotropic effects, among which stem elongation stands out (Azcón and Talón, 2013; Taiz *et al.*, 2015).

In this regard, it has been reported that benzylaminopurine cytokinin promoted growth, the accumulation of soluble protein and delayed foliar senescence in *Dactylis glomerata* grass, regulating signaling through H_2O_2 , in the accumulation of the antioxidant ascorbic acid and ascorbate peroxidase activity, with a protective function against the oxidative stress of senescence (Wilson *et al.*, 2008).

The tiller height in cut 1 reflected that the bioregulators and the biostimulant were favorable when they were applied in that time interval, since it had little precipitation (42.6 mm) (Table 3) and was located towards the end of the period of less precipitation (figure 1), so the products could be applied at that time, as well as considering other doses and types of products. In this regard, Guilcapi *et al.* (2019) obtained that the time of application of gibberellins, cytokinins

acumulación de proteína soluble y retrasó la senescencia foliar en el pasto *Dactylis glomerata*, regulando la señalización mediante el H_2O_2 , en la acumulación del antioxidante ácido ascórbico y actividad del ascorbato peroxidasa, con una función protectora ante el estrés oxidativo de la senescencia (Wilson *et al.*, 2008).

La altura de macolla en el corte 1 reflejó que los biorreguladores y el bioestimulante fueron favorables cuando se aplicaron en ese intervalo de tiempo, ya que tuvo poca precipitación (42,6 mm) (cuadro 3) y estuvo ubicado hacia el final del periodo de menor precipitación (figura 1), por lo que los productos se podrían aplicar en ese momento, así como, considerar otras dosis y tipos de productos. Al respecto, Guilcapi *et al.* (2019) obtuvieron que la época de aplicación de giberelinas, citocininas y etileno afectó la altura de planta. En otros pastos, la mezcla de auxinas, giberelinas y citocininas incidió sustancialmente en el desarrollo de *B. decumbens* (Mora, 2013), lo cual coincide con lo observado en la presente investigación. Por el contrario, en *Arrhenatherum elatius* los tratamientos con giberelinas, citocininas y etileno no produjeron cambios en la altura del cultivo (Guilcapi *et al.*, 2019).

Los biorreguladores y el bioestimulante no influyeron en el rendimiento de MS, lo que coincide con lo publicado por Guilcapi *et al.* (2019), quienes señalaron que las giberelinas, las citocininas y el etileno no influyeron en el rendimiento de MS de *A. elatius*. Sin embargo, los resultados obtenidos difirieron del trabajo realizado por

and ethylene affected plant height. In other grasses, the mixture of auxins, gibberellins and cytokinins had a substantial impact on the development of *B. decumbens* (Mora, 2013), which coincides with what was observed in the present investigation. On the contrary, in *Arrhenatherum elatius* the treatments with gibberellins, cytokinins and ethylene did not produce changes in the height of the crop (Guilcapi *et al.*, 2019).

Bioregulators and biostimulant did not influence DM performance, which coincides with that published by Guilcapi *et al.* (2019), who pointed out that gibberellins, cytokinins and ethylene did not influence the DM yield of *A. elatius*. However, the results obtained differed from the work carried out by Rocha *et al.* (2019) in *B. decumbens*, in which the bioregulators notably improved DM performance when using high levels of Stimulate® (kinetin, gibberellic acid and indolebutyric acid) (16 to 24 mg kg⁻¹). On the contrary, in the forage plant triticale cv. INCA TT-7 (x *Triticosecale* sp.), Plana *et al.* (2016) found that treatment with bioproducts -Ecomic® biofertilizer (arbuscular mycorrhizal fungi) and Fitomas-E® biostimulant (mainly amino acids, bioactive oligosaccharides)- increased DM production, quality and nutritional value of forage, and content of crude protein.

Conclusions

Shading affected the development and yield of Mombaza grass (*Panicum maximum* Jacq.). Guinea grass

Rocha *et al.* (2019) en *B. decumbens*, en el cual los biorreguladores mejoraron notablemente el rendimiento de MS cuando utilizaron niveles altos de Stimulate® (kinetina, ácido giberélico y ácido indolbutírico) (16 a 24 mg.kg⁻¹). Por el contrario, en la planta forrajera triticale cv. INCA TT-7 (*x Triticosecale* sp.), Plana *et al.* (2016) encontraron que el tratamiento con bioproductos -biofertilizante Ecomic® (hongos micorrízicos arbusculares) y bioestimulante Fitomas-E® (principalmente aminoácidos, oligosacáridos bioactivos)- incrementó la producción de MS, la calidad y el valor nutricional del forraje, y el contenido de proteína cruda.

Conclusiones

El sombreado afectó el desarrollo y el rendimiento del pasto Mombaza (*Panicum maximum* Jacq.). El pasto guinea establecido a plena exposición solar aumentó la altura, el número de tallos.macolla¹ y el rendimiento de materia seca. Sin embargo, altos niveles de sombra favorecieron el número de macollas.m².

La aplicación de biorreguladores a dosis mínima influyó sobre la altura de macolla en el primer corte en el periodo de mínima precipitación.

La interacción entre el sombreado y la aplicación de biorreguladores y bioestimulante no influyó sobre el desarrollo y rendimiento del pasto.

Los resultados obtenidos del efecto del sombreado y de la aplicación de biorreguladores y estimulante sobre el desarrollo y el rendimiento de MS del pasto Mombaza, representan una

established at full sun exposure increased height, number of stems. tiller⁻¹ and dry matter yield. However, high levels of shade favored the number of tillers.m⁻².

The application of bioregulators at a minimum dose influenced the height of the clump in the first cut in the period of minimum precipitation.

The interaction between shading and the application of bioregulators and biostimulant did not influence the development and performance of the pasture.

The results obtained from the effect of shading and the application of bioregulators and stimulants on the development and DM yield of Mombaza grass, represent a contribution to the study of this species, by virtue of the fact that no information was found, and lay the foundations for further investigations.

Acknowledgement

To Eng. Lucy Zambrano Villarreal, owner of the “La Maravilla” farm in the Praderas del Toachi site, for providing the facilities for the development of this research.

End of English Version

contribución al estudio de esta especie, en virtud de que no se encontró información, y sientan las bases para posteriores investigaciones.

Agradecimientos

A la Ing. Lucy Zambrano Villarreal propietaria de la finca “La Maravilla”

del recinto Praderas del Toachi, por facilitar las instalaciones para el desarrollo de esta investigación.

Literatura Citada

- Aguilar, G., M. Solís, R. Castro, V. López, J. Lara y M. Esteves. 2020. Efecto de bacterias PGPB, composta y digestato en el rendimiento de materia seca de pasto ovollo. REMEXCA. 24: 117-127.
- Alonso, J., G. Febles, T. Ruiz y G. Achang. 2006. Efecto de la sombra en la gramínea asociada en un sistema silvopastoril de leucaena-guinea durante sus diferentes etapas. Rev. cuba. cienc. agríc. 40(4): 503-511.
- Araujo, O. 2014. Calidad de los pastos tropicales y productividad animal. Logros y Desafíos de la Ganadería Doble Propósito. C. González-Stagnaro, N. Madrid-Bury, E. Soto Belloso (Eds). Fundación GIRARZ. Maracaibo, Zulia. Venezuela. Capítulo XXIV: 235-245.
- Azcón, J. y Talón M. 2013. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Segunda Edición. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 669 p.
- Blanco, Y., M. Afifi y C. Swanton. 2015. Efecto de la calidad de la luz en el cultivo del maíz: una herramienta para el manejo de plantas arvenses. Cult. trop. 36(2): 62-71.
- Carrilho, P., J. Alonso, L. Santos y R. Sampaio. 2012. Comportamiento vegetativo y reproductivo de *Brachiaria decumbens* vc. Basilisk bajo diferentes niveles de sombra. Rev. cuba. cienc. agríc. 46(1): 85-90.
- Du Jardin, P. 2015. Plant Biostimulants: Definition, Concept, Main Categories and Regulation. Rev. Scientia Horticulturae. 196: 3-14.
- Encinozo, O., S. Camacaro, L. Pinto y L. Ríos. 2017. Efecto de la presencia de sombra en áreas de pastoreo de ovinos. 1. Selección de especies forrajeras. Pastos y Forrajes. 40(1): 65-72.
- Guilcapi, E., M. Guallpa y L. Ortiz. 2019. Efecto de diferentes dosis de humus, fitohormonas y tiempos de aplicación en la producción primaria del pasto *Arrhenatherum elatius*. European Scientific Journal. 15(15): 309-322.
- INAMHI. 2019. Datos de precipitación y temperatura. Red de estaciones meteorológicas e hidrológicas del Ecuador. Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. Disponible en: <https://inamhi.wixsite.com/inamhi/novedades>. Fecha de consulta: octubre 2019.
- INEC. 2019. Tabulados de la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC 2019. Disponible en: https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2019/Tabulados_%20ESPAC%202019.xlsx. Fecha de consulta: octubre 2019.
- Jank, L. 1995. Melhoramento e seleção de variedades de *Panicum maximum*. Anais do 12 Simpósio sobre Manejo da Pastagem. FEALD. Peixoto, A.M.; De Moura, J.C.; y De Faria (Eds), U.P.C.P. 329, A.V. Carlos Botelho, 1025, 13400-970, Piracicaba, SP. Brasil. pp. 21-58.
- MAG. 2019. Sistema de Información Pública Agropecuaria (SIPA). Estadísticas Productivas. Precipitaciones. Disponible en: http://sipa.agricultura.gob.ec/descargas/base-estadistica/modulo_productivo/superficie-produccion.xlsx. Fecha de consulta: noviembre 2019.
- Matheus, D. y J. Ordus. 2016. Efecto de la plantación sobre el rendimiento y crecimiento vegetativo de la naranja "Valencia" (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) en el trópico bajo húmedo de Colombia. Ornoquia. 20(1): 19-27.
- Milera, M. 2013. Contribución de los sistemas silvopastoriles en la producción y el medio ambiente. Avances en Investigación Agropecuaria. 17(3): 7-24.
- Mora, J. 2013. Efectos de aplicación de fitohormonas sobre el crecimiento y rendimiento de forraje del pasto Dallis (*Brachiaria decumbens*), en la






- zona de Febres-Cordero, provincia de Los Ríos. Universidad Técnica de Babahoyo, Facultad de Ciencias Agropecuarias - Ecuador. 72 p. Disponible en: <http://www.dspace.utb.edu.ec/handle/49000/210>. Fecha de consulta: noviembre 2019.
- Navarro, O. e I. Corpas. 2012. Evaluación de diferentes frecuencias de corte en guinea Mombaza, bajo condiciones de sol y sombra natural influenciada por el dosel del campano, Sucre. Revista Colombiana Ciencia Animal. 4(2): 377-395.
- Obispo, N., Y. Espinoza, J. Gil, F. Ovalles y M. Rodríguez. 2008. Efecto del sombreado sobre la producción y calidad del pasto guinea (*Panicum maximum*) en un sistema silvopastoril. Zootec. Tropic. 26(3): 285-288.
- Obispo, N., Y. Espinoza, J. Gil, F. Ovalles, E. Cabrera y M. Pérez. 2013. Relación de la proporción de sombra en el potrero con el rendimiento, calidad del forraje y ganancia diaria de peso en novillos. Revista Científica FCV-LUZ. 23(6): 531-536.
- Oliveira, W., E. Lima, D. Gomes, K. Alves, P. Santos, G. Azevedo and R. Mezzomo. 2019. Agronomic performance of Marandu grass treated with plant growth biostimulants in the Amazon biome. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 71(2): 603-612.
- Plana, R., P. González y F. Soto. 2016. Uso combinado de Ecomic®, Fitomas-E® y fertilizantes minerales en la producción de forraje para la alimentación animal a base de triticale (x. *Triticosecale* Wittmack), cv INCA TT-7. Cult. trop. 37(4): 76-83.
- Ramírez, M., A. Urdaneta, V. Urdaneta y D. García. 2017. Efecto de los tratamientos pregerminativos en la emergencia y en el desarrollo inicial del cotoperiz [*Talisia oliviformis* (Kunth) Radlk]. Pastos y Forrajes. 40(1): 16-22.
- Ramírez, O., A. Hernández, S. Carneiro, J. Pérez, J. Enríquez, A. Quero, J. Herrera y A. Cervantez. 2009. Acumulación de forraje, crecimiento y características estructurales del pasto Mombaza (*Panicum maximum* Jacq.) cosechado a diferentes intervalos de corte. Técnica Pecuaria en México. 47(2): 203-213.
- Rocha, L., F. Teixeira, M. Pedreira, D. Fries, D. Santos, E. Leite, A. De Figueiredo, A. Seixas, C. Pacheco and B. Santiago. 2019. Plant growth regulator and soil fertilizer improve production and growing stage of *Brachiaria decumbens*. Grassland Science. 00: 1-8.
- Taiz, L., E. Zeiger, I. Moller and A. Murphy. 2015. Plant Physiology and Development. Sixth Edition, Sinauer Associates, Sunderland, CT. EE.UU. 761 p.
- Velasco, M., A. Hernández, H. Vaquera, J. Martínez, P. Hernández y J. Aguirre. 2018. Análisis de crecimiento de Pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) cv. Mombaza. Revista MVZ Córdoba. 23(Supl): 6951-6963.
- Wilson, C., H. Zavaleta, H. López y A. Hernández. 2008. La citocinina BAP retrasa senescencia, aumenta antioxidantes, proteína y crecimiento en el pasto ovillo (*Dactylis glomerata* L.). Agrociencia. 42: 799-806.

Aprovechamiento de la almendra de semilla de mango para la obtención de aceite de repostería

Use of mango seed almonds to obtain pastry oil

Uso de amêndoas de semente de mangue para obter o óleo de massa

Eileen Chiquinquirá Sanz M.¹, Diana Isadora Dix S.¹,
Aycardo Emilio Robayo R.¹, Oscar Javier Bernal L.² y Jorge
Eliecer Carrillo V.²

¹Uniagustiniana, Avenida Ciudad de Cali #11b-95. Colombia-Bogotá 760002. Correo electrónico: (ES) eileensanz27@gmail.com; ; (DD) diana.dix@uniagustiniana.edu.co; ; (AR) aycardo.robayo@uniagustiniana.edu.co; . ²Universidad Militar Nueva Granada, km 2 vía Cajicá Zipaquirá. Colombia-Bogotá. 250247. Correo electrónico: (OB) oscar.bernal@unimilitar.edu.co; ; (JC) jorge.carrillo@unimilitar.edu.co, .

Resumen

Los residuos del mango, resultado de los procesos de transformación de la fruta, normalmente no son procesados debido a que no poseen valor industrial para la producción de jugos, mermeladas, entre otros derivados; situación que contribuye a problemas ambientales cuando no son dispuestos adecuadamente. Por tal motivo se planteó la presente investigación, cuyo objetivo fue aprovechar los residuos de las semillas del mango variedad Tommy Atkins (*Mangifera indica* L.), para la obtención de aceites útiles en la elaboración de productos de repostería. Para llevar a cabo la extracción del aceite, se utilizó un extractor Soxhlet con hexano al 99 % de pureza a un punto de ebullición entre 68 - 75°C. Entre los resultados obtenidos se encontró que el aceite presenta ácido esteárico ($40,4 \pm 0,01 \text{ g.100 g}^{-1}$) en mayor proporción, seguido de oleico ($33,6 \pm 0,02 \text{ g.100 g}^{-1}$), palmítico ($12,0 \pm 0,01 \text{ g.100 g}^{-1}$), linoleico ($8,1 \pm 0,2 \text{ g.100g}^{-1}$), linolénico ($1,6 \pm 0,02 \text{ g .100g}^{-1}$) y ácido araquídico ($3,0 \pm 0,04 \text{ g .100g}^{-1}$). A partir del aceite obtenido se realizaron formulaciones tradicionales de repostería tales como trufas de chocolate, genovesa, ganache y biscuit rápido de chocolate, sustituyendo el 100 % de aceite de girasol comercial. Posteriormente, se probó la aceptación de

Recibido el 23-07-2020 • Aceptado el 20-10-2020.

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: eileensanz27@gmail.com

los productos, a través de una evaluación sensorial, aplicada a 50 panelistas no entrenados, quienes compararon los productos elaborados con aceite comercial versus los preparados con aceite de almendra de mango; siendo los de mayor aceptación el ganache (60 %) y las trufas de chocolate (64 %).

Palabras clave: Aceite de semilla de mango, ácidos grasos, residuos de mango, trufas de chocolate.

Abstract

The Mango residues, the result of fruit processing processes, are normally not processed because they have no industrial value for the production of juices, jams, among other derivatives; contributing to environmental problems when they are not adequately disposed of. For this reason, this research was raised; the objective of which was to take advantage of the seeds residues of the Tommy Atkins variety mango (*Mangifera indica* L.), for the production of useful oils in the production of pastry products. To carry out the oil extraction, a Soxhlet extractor with hexane of 99 % purity at a boiling point between 68-75 ° C was used. Among the results obtained, it was found that the oil has stearic fatty acid ($40.4 \pm 0.01 \text{ g.100 g}^{-1}$) in a higher proportion, followed by oleic ($33.6 \pm 0.02 \text{ g.100 g}^{-1}$), palmitic ($12, 0 \pm 0.01 \text{ g.100 g}^{-1}$), linoleic ($8.1 \pm 0.2 \text{ g.100 g}^{-1}$), linolenic ($1.6 \pm 0.02 \text{ g.100 g}^{-1}$) and finally arachidic acid ($3.0 \pm 0.04 \text{ g.100 g}^{-1}$). From the oil obtained, traditional formulations for pastry products such as chocolate truffles, Genovese, ganache and quick chocolate biscuit were made, replacing 100 % of commercial sunflower oil. Subsequently, the acceptance of the products was tested, through a sensory evaluation, applied to 50 untrained panelists, who compared the products made with commercial oil versus those made with mango almond oil; the most widely accepted being the use of the latter in ganache (60 %) and chocolate truffles (64 %).

Keywords: Mango seed oil, fatty acids, mango residues, chocolate truffles.

Resumo

Resíduos de manga, resultantes de processos de transformação de frutas, normalmente não são processados por não possuírem valor industrial para a produção de sucos, geléias, entre outros derivados; situação que contribui para os problemas ambientais quando não são descartados de forma adequada. Por esse motivo, foi proposta a presente investigação, cujo objetivo foi aproveitar os resíduos das sementes da variedade de manga Tommy Atkins (*Mangifera indica* L.), para obter óleos úteis no preparo de produtos de confeitaria. Para realizar a extração do óleo, foi utilizado um extrator Soxhlet com hexano de 99% de pureza com ponto de ebulição entre 68 - 75 ° C. Dentre os resultados obtidos, constatou-se que o óleo apresenta ácido esteárico ($40,4 \pm 0,01 \text{ g.100 g}^{-1}$) em maior proporção, seguido do ácido oleico ($33,6 \pm 0,02 \text{ g.100 g}^{-1}$), palmítico ($12,0 \pm 0,01 \text{ g.100 g}^{-1}$),

linoléico ($8,1 \pm 0,2 \text{ g.}100 \text{ g}^{-1}$), linolénico ($1,6 \pm 0,02 \text{ g.}100 \text{ g}^{-1}$) e ácido araquídico ($3,0 \pm 0,04 \text{ g.}100 \text{ g}^{-1}$). A partir do óleo obtido, foram feitas formulações de confeitaria tradicionais como trufas de chocolate, Genovese, ganache e biscoito de chocolate rápido, em substituição ao óleo de girassol 100 % comercial. Posteriormente, a aceitação dos produtos foi testada, por meio de uma avaliação sensorial, aplicada a 50 provadores não treinados, que compararam os produtos elaborados com óleo comercial versus os fabricados com óleo de amêndoa de manga; os mais aceitos são ganache (60 %) e trufas de chocolate (64 %).

Palavras-chave: óleo de semente de manga, ácidos graxos, resíduos de manga, trufas de chocolate.

Introducción

El mango es una de las variedades de frutas tropicales de mayor producción, ocupando el 52 % del total de las principales frutas tropicales a nivel mundial (FAO, 2018). En Colombia, la zonificación de mayor productividad del sector manguicultor está representada por la zona centro y costa caribe, siendo los departamentos con mayores hectáreas cultivadas, Cundinamarca (7.260 ha), seguido de Tolima (7.028 ha) y el Magdalena (2.858 ha), representando el 68 % del total de área sembrada en el país, según el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE, 2020). Dentro del territorio colombiano se cultivan muchas variedades de mango, siendo las más destacadas: Tommy Atkins (20 %) y Keitt (11 %). (Corrales *et al.*, 2014). La variedad Tommy Atkins se caracteriza por su dulzura, sabor, olor y es considerada unas de las variedades abundantes en el país (Corpoica; Asohofrucol, 2013).

La comercialización del mango es muy popular debido a su composición nutricional presentando calorías

Introduction

Mango is one of the highest producing tropical fruit crops, accounting for 52 % of the world's top tropical fruits (FAO, 2018). In Colombia, the area with the highest mango productivity is in the center of the country and the Caribbean coast, being the departments with the largest cultivated hectares, Cundinamarca (7.260 ha), followed by Tolima (7.028 ha) and Magdalena (2.858 ha), representing 68 % of the total area sown in the country, according to the National Administrative Department of Statistics (DANE, 2020). Within the colombian territory many varieties of mango are cultivated, the most prominent being: Tommy Atkins (20 %) and Keitt (11 %) (Corrales *et al.*, 2014). The Tommy Atkins variety is characterized by its sweetness, taste and smell; it is one of the most abundant varieties in the country (Corpoica; Asohofrucol, 2013).

Mango marketing is very popular due to its nutritional composition presenting 60 calories, 83 % water, proteins 0.4 g.100 g⁻¹, lipids 0.2 g.100 g⁻¹, carbohydrates 15.9 g.100 g⁻¹, fiber 1 g.100 g⁻¹, ash

(60 cal), agua (83 %), proteínas (0,4 g.100 g⁻¹), lípidos (0,2 g.100 g⁻¹), carbohidratos (15,9 g.100 g⁻¹), fibra (1 g.100 g⁻¹), cenizas (0,5 g.100 g⁻¹), tiamina (0,03 mg.100 g⁻¹), riboflavina (0,05 mg.100 g⁻¹), niacina (0,39 mg.100 g⁻¹) y ácido ascórbico (1,8 mg.100 g⁻¹) (Sumaya *et al.*, 2012). Por ser una fruta muy apetecible y con grandes aportes nutricionales es considerada materia prima para las industrias de alimentos, quienes utilizan principalmente la pulpa y desechan el bagazo, semillas y piel, representando entre un 40 a 60 % de la masa total de la fruta (Jahurul *et al.*, 2015; Nzikou *et al.*, 2010).

Específicamente, la almendra de mango, ha sido objeto de estudio para diferentes variedades, debido a su contenido graso que oscila entre 8,5 % y 10,4 % según la variedad. (Muchiri *et al.*, 2012; Sogi *et al.*, 2013). Así mismo, su composición lipídica le hace tener un potencial en las aplicaciones de la industria chocolatera, como sustituto de la manteca de cacao en la elaboración de confites y en la elaboración del chocolate. (Nzikou *et al.*, 2010; Bustamante *et al.*, 2010), convirtiéndolo en una alternativa para la obtención de nuevas fuentes de aceites, debido a que sus características químicas permiten diversas aplicaciones en la industria de alimentos. Razón por la cual el objetivo de presente estudio fue evaluar los residuos de las semillas específicamente la almendra de mango de la variedad Tommy Atkins (*Mangifera indica* L.), para la obtención de aceites y su aplicación en la elaboración de

0.5 g.100 g⁻¹, thiamin 0.03 mg.100 g⁻¹, riboflavin 0.05 mg.100 g⁻¹, niacin 0.39 mg.100 g⁻¹ and ascorbic acid 1.8 mg.100 g⁻¹ (Sumaya *et al.*, 2012). Being a very appetizing fruit and with great nutritional contributions is considered a raw material for the food industries, who mainly use pulp and discard bagasse, seeds and skin, representing between 40 to 60 % of the total mass of the fruit (Jahurulet *et al.*, 2015; Nzikou *et al.*, 2010).

Mango almonds of different varieties have been studied, due to their fat content ranging between 8.5 % and 10.4 % (Muchiriet *al.*, 2012; Sogiet *al.*, 2013). Likewise, its lipid composition makes it have a potential in the applications of the chocolate industry, as a substitute for cocoa butter in the confectionery and chocolates production (Nzikou *et al.*, 2010; Bustamante *et al.*, 2010). Mango almonds are an alternative for obtaining new sources of oils, because their chemical characteristics allow various applications in the food industry. Therefore, the objective of this study was to evaluate the oil obtained from the almond of the Tommy Atkins mango seed (*Mangifera indica* L.), for the production of pastry products, in order to take advantage of its industrialization potential.

Materials and methods

Raw material

Samples of mango (*Mangifera indica* L.) Tommy Atkins seeds were used, supplied by the juice processing company "Mandarin", located in Bogotá, Colombia. The almonds

productos de repostería y de esta manera, aprovechar tecnológicamente las almendras del mango variedad Tommy Atkins.

Materiales y métodos

Materia prima

Se utilizaron muestras de semillas de Mango (*Mangifera indica* L.) de la variedad Tommy Atkins, suministradas por la empresa procesadora de jugos Mandarín, ubicada en la ciudad de Bogotá, Colombia. La obtención de las almendras se realizó siguiendo el método reportado por Tapia *et al.* (2013) con modificaciones en la desinfección y tamaño de la partícula. Las semillas fueron lavadas con agua para eliminar los residuos de pulpa adheridos al endocarpio duro y fibroso, se extrajo la almendra de manera manual y se sumergieron en una solución con ácido peracético proporción 1:3 (v/v) para su desinfección.

Posteriormente, las almendras fueron secadas en un horno con principio de convección forzada (Marca Isotherm, modelo OFA-110-9), calentado a 55 °C durante 15 horas hasta llegar a una humedad final de 10 a 11 %. Una vez secas las almendras, se molió y tamizó hasta obtener una harina con un tamaño de partícula de 0,250 mm para una eficiente extracción del aceite.

Extracción del aceite

Se realizaron cinco extracciones, utilizando 100 g de harina de la almendra de mango para cada una, empleando como solvente extractor hexano al 99 % (Merck, grado reactivo)

was obtained following the method reported by Tapia *et al.* (2013) with modifications in disinfection and particle size. The seeds were washed with water to remove the pulp residues adhered to the hard and fibrous endocarp. The almond was extracted manually and they were immersed in a solution with peracetic acid, ratio 1: 3 (v/v) for disinfection.

Subsequently, the almonds were dried at 55 °C for 15 hours up to 10 to 11 % humidity, using a forced convection oven (Isotherm brand, model OFA-110-9). Once the almonds were dry, they were ground and sieved until obtaining flour with a particle size of 0,250 mm for efficient oil extraction.

Oil extraction

Five extractions were performed, using 100 g of mango almond flour in each one and a 99 % hexane extracting solution (Merck, reagent grade). The extractions were carried out at a boiling point between 68 and 75 °C with reflux for eight (8) hours in a Soxhlet equipment. Solvent recovery was carried out by distillation on a rotary evaporator (Heidolph Brand). The extract was dried for 30 min at 110 °C in an oven (Isotherm brand, model OFA-110-9) until the residual solvent was eliminated (AOAC, 2002).

Proximal analysis of mango almond flour

The proximal analysis consisted of the quantification of moisture (Gravimetry), protein (International Organization for Standardization, 2009), dietary fiber (AOAC, 2003), fat (Colombian Institute of Technical Standards and Certification, 1973),

y un punto de ebullición entre 68 y 75 °C con reflujo de ocho (8) horas en un equipo Soxhlet, la recuperación del solvente se realizó por destilación en un evaporador rotatorio (Marca Heidolph). El extracto fue sometido a un secado por 30 min a 110°C en un horno (Marca Isotherm, modelo OFA-110-9) hasta eliminar el solvente residual (AOAC, 2002).

Análisis proximal de la harina de la almendra de mango

El análisis proximal consistió en la cuantificación de humedad (Gravimetría), proteína (International Organization for Standardization, 2009), fibra dietaria (Association of Official Analytical Chemists, 2003), grasa (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, 1973), cenizas (American Association of Cereal Chemists, 2001), almidón (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, 2009), y los carbohidratos totales fueron obtenidos por diferencia. El análisis se llevó a cabo por triplicado por un laboratorio certificado (ENZIPAN, Bogotá, Colombia).

Caracterización física y química del aceite

Los parámetros determinados fueron: densidad (Norma técnica colombiana 254:1998) acidez (Norma técnica colombiana 440:1971), índice de peróxidos (AOAC 965.33; 1969), índice de yodo (Norma técnica colombiana 283:1998), punto de fusión (Norma técnica colombiana 5033:2016), índice de saponificación (Norma técnica colombiana 335:2019) y perfil de ácidos grasos (ISO 12966-1), los cuales se realizaron por

ashes (American Association of Cereal Chemists, 2001) and starch (Colombian Institute of Technical Standards and Certification, 2009); total carbohydrates were obtained by difference. The analysis was carried out in triplicate by a certified laboratory (ENZIPAN, Bogotá, Colombia).

Physical and chemical characterization of the oil

The parameters determined were: density (NTC 254: 1998) acidity (NTC 440: 1971), peroxide value (AOAC 965.33; 1969), iodine value (NTC 283: 1998), melting point (NTC 5033: 2016), saponification value (NTC 335: 2019) and fatty acid profile (ISO 12966-1), which were performed in triplicate in a certified laboratory (ENZIPAN, Bogotá, Colombia).

Pastry Products: formulation and processing

Four (4) pastry products were made: chocolate truffles, Genovese, ganache and quick chocolate biscuit. For the elaboration of the products, traditional formulations were used (Table 1). On the one hand, the total replacement of the commercial fat was carried out with the oil obtained from the mango almond; and on the other hand, products were made with 100% commercial fat (Gisslen, 2014).

The sensory acceptance of the bakery products was carried out with an untrained panel of 50 people (non-probabilistic sample for convenience), in a lighted, silent and odor-free place. The attributes evaluated were smell, color, flavor and texture. A five (5) point hedonic scale was used: 1: I dislike it, 2: I dislike it a lot, 3: I don't

triplicado en un laboratorio certificado (ENZIPAN, Bogotá, Colombia).

Productos de Repostería: formulación y procesamiento

Se elaboraron cuatro (4) productos de repostería: trufas de chocolate, genovesa, ganache y biscuit rápido de chocolate. Para la elaboración de los productos se utilizaron formulaciones tradicionales (Cuadro 1) realizando el reemplazo total de grasa comercial por el aceite de almendra de mango obtenido y productos con el 100 % de grasa comercial, siguiendo el método descrito por Gisslen. (2014).

like it, nor do I dislike it, 4: I like it, 5: I like it a lot (Carpenter; 2009).

Statistic analysis

An analysis of variance (ANOVA) was applied to calculate the significant differences between the products, at a probability level of 5% ($p < 0.05$) using the Minitab statistical package, version 18.0.

Results and discussion

Proximal analysis of the mango almond flour

Table 2 presents the results

Cuadro 1: Formulaciones utilizadas en la elaboración de los productos de repostería.

Table 1: Formulations used in the preparation of confectionery products.

Ingredientes	Formulación (%)			
	Biscuit de chocolate	Genovesa	Ganache de Chocolate	Trufas de chocolate
Harina de trigo	17	29	0	0
Azúcar	20	37	0	3
Aceite (Grasa)	10	12	22	6
Cacao	7	0	0	0
Glucosa	0	0	0	0
Crema de leche	17	0	13	17
Leche entera	21	0	0	0,43
Huevos	0	24	0	0
sal	0	0,2	0	0
Chocolate	8	0	65	69
Frutos secos	0	0	0	4,3

Evaluación de la aceptabilidad sensorial.

Sensory evaluation

La aceptación sensorial de los productos de repostería se llevó a cabo con un panel no entrenado de 50

obtenidos en el análisis proximal de la harina obtenida de Tommy Atkins mango almendras.

personas (muestra no probabilística por conveniencia), en un lugar iluminado, silencioso y libre de olores. Los atributos evaluados fueron olor, color, sabor y textura. Se empleó una escala hedónica de cinco (5) puntos: siendo 1: me disgusta, 2: me disgusta mucho, 3: no me gusta ni me disgusta, 4: me gusta, 5: me gusta mucho, determinando así el grado de aceptabilidad sensorial para cada producto (Carpenter; 2009).

Análisis estadístico

A los datos obtenidos se les aplicó un análisis unidireccional de varianza (ANOVA), para calcular las diferencias significativas entre los productos, a un nivel de probabilidad del 5 % ($p < 0,05$) empleando el paquete estadístico Minitab versión 18.0.

Resultados y discusión

Análisis proximal de la harina de las almendras de mango

En el cuadro 2 se presentan los resultados obtenidos en el análisis proximal de la harina obtenida con las almendras de mango variedad Tommy Atkins.

Se obtuvo un contenido de fibra de $2,44 \pm 0,09$ g.100 g⁻¹, menor a los encontrados para las variedades Alphonso, 6,42 g.100 g⁻¹ (Gutiérrez *et al.*, 2015) y lorito 6,0 g.100 g⁻¹ (Hernández *et al.*, 2016).

De la misma manera, el porcentaje de humedad obtenido en la harina de almendras de mango ($43,5 \pm 2,47$ g.100 g⁻¹) es menor a los reportados en mango de la variedad Manila 80,20 g.100 g⁻¹ (Tapia *et al.*, 2013) y la variedad Alphonso 45,43 g.100 g⁻¹ (Gutiérrez *et al.*, 2015).

A fiber content of 2.44 ± 0.09 g.100 g⁻¹ was obtained, lower than those found for the varieties Alphonso, 6.42 g.100 g⁻¹ (Gutiérrez *et al.*, 2015) and Lorito, 6.0 g.100 g⁻¹ (Hernández *et al.*, 2016).

In the same way, the percentage of moisture obtained in the mango almond flour (43.5 ± 2.47 g.100 g⁻¹) is lower than those reported in the Manila variety 80.20 g.100 g⁻¹ (Tapia *et al.*, 2013) and the variety Alphonso 45.3 g.100 g⁻¹ (Gutiérrez *et al.*, 2015).

The protein component (5.20 ± 0.20 g.100 g⁻¹), was lower than those obtained in Alphonso 6.17 g.100 g⁻¹ (Gutiérrez *et al.*, 2015), Manila (6.23 g.100 g⁻¹) and Haden (5.46 g.100 g⁻¹) varieties as reported by Bustamante *et al.* (2010).

The fat values obtained (9.93 ± 0.84 g.100 g⁻¹) are higher than the content reported in the Alphonso variety 7.57 g.100 g⁻¹ (Gutiérrez *et al.*, 2015). Although they do not present values as high as those obtained in the Manzano variety 11.3 g.100 g⁻¹ and Rosa variety 11.8 g.100 g⁻¹ (Hernández *et al.*, 2016). Some research indicates the quality of mango almond flour for the extraction of essential oils (Nzikou *et al.*, 2010).

The ashes presented values of 2.30 g.100 g⁻¹, similar to those reported by Nzikou *et al.* (2010) in mango. In contrast, these values are lower than those found in the Alphonso variety 2.48 g.100 g⁻¹ (Gutiérrez *et al.*, 2015) and mangoes of the genus *Mangifera* from Nigeriawith 2.62 g.100 g⁻¹ (Fowomola 2010).

El componente proteico ($5,20 \pm 0,20 \text{ g.100 g}^{-1}$), resultó inferior a los obtenidos en semillas de mango variedad Alphonso $6,17 \text{ g.100 g}^{-1}$. (Gutiérrez *et al.*, 2015) y a las variedades Manila ($6,23 \text{ g.100 g}^{-1}$) y Haden ($5,46 \text{ g.100 g}^{-1}$) reportadas por Bustamante *et al.* (2010).

The carbohydrate content presents a value similar to those reported for the Alphonso variety, $31.93 \text{ g.100 g}^{-1}$ (Gutiérrez *et al.*, 2015).

The differences found in the proximal analysis of the flours could be due to the properties of

Cuadro 2: Análisis proximal de la harina de las almendras de los mangos variedad Tommy Atkins.

Table 2: Proximal analysis of Tommy Atkins mango almond flour.

Parámetros*	Porcentaje (%)
Fibra cruda	$2,44 \pm 0,09$
Humedad	$43,5 \pm 2,47$
Proteína	$5,20 \pm 0,20$
Grasas	$9,93 \pm 0,84$
Cenizas	$2,30 \pm 0,24$
Almidón	$51,75 \pm 0,20$
Carbohidratos totales	36,63

*Los valores se expresan en peso seco. Los datos son la media \pm desviación estándar.

* Values are expressed in dry weight, from the mean \pm standard deviation.

Los valores de grasa obtenidos ($9,93 \pm 0,84 \text{ g.100 g}^{-1}$) son mayores al contenido reportado en mangos variedad Alphonso $7,57 \text{ g.100 g}^{-1}$ (Gutiérrez *et al.*, 2015). Aunque no presentan valores tan altos como los obtenidos en las variedades Manzano $11,3 \text{ g.100 g}^{-1}$ y Rosa $11,8 \text{ g.100 g}^{-1}$ (Hernández *et al.*, 2016); diversas investigaciones señalan la calidad de la harina de almendra de mango para la extracción de aceites esenciales a partir de dichas semillas (Nzikou *et al.*, 2010).

Las cenizas presentaron valores de $2,30 \text{ g.100 g}^{-1}$, similares a los reportados

the soil, climate, temperature, the variety used in this study, the state of maturation of the fruit and the conditions of the seeds.

Physical and chemical characterization of the oil extracted from the mango almond

The acidity value is lower ($1.6 \pm 0.2 \%$) than that reported in Manila (3.11%), Keitt (2.17%) and Kent (2.5%) varieties (Bustamante *et al.*, 2010).

The iodine value ($94.2 \pm 0.01 \%$ of absorbed iodine) is considered higher than that reported for the stearins present in the Manila variety (32.84

por Nzikou *et al.* (2010) en mango, y menores a los hallados en mangos de la variedad Alphonso 2,48 g.100 g⁻¹ (Gutiérrez *et al.*, 2015) y mangos del género *Mangifera* de Nigeria con un 2,62 g.100 g⁻¹ (Fowomola 2010).

El contenido de carbohidratos presenta un valor similar a los reportados para la variedad de mango Alphonso 31,93 g.100 g⁻¹ (Gutiérrez *et al.*, 2015).

Las diferencias encontradas en el análisis proximal de las harinas pudieran deberse a las características agronómicas del cultivo en cuanto a las propiedades del suelo, clima y temperatura; la variedad empleada para el estudio y al estado de maduración del fruto y semillas utilizadas.

Caracterización física y química del aceite extraído de la almendra de mango

En el cuadro 3 se presentan los resultados obtenidos en la caracterización física y química del aceite extraído de la almendra de mango los cuales determinan y garantizan la calidad del aceite extraído.

El índice de acidez obtenido presenta en promedio un valor menor (1,6 ± 0,2 %), al reportado en mangos variedades Manila (3,11 %), Keitt (2,17 %) y Kent (2,5 %). (Bustamante *et al.*, 2010).

El valor de índice de yodo obtenido (94,2 ± 0,01 % de yodo absorbido) se considera mayor al reportado para las estearinas presentes en mangos de la variedad Manila (32,84 %) de yodo absorbido (Bustamante *et al.*, 2010). Sin embargo, los altos valores

(Bustamante *et al.*, 2010). These high values reveal a lower resistance to oxidation, causing a shorter oil life (Kittiphoom, 2012).

The saponification value represents the average molecular mass of fats and shows the quality of the oil for human consumption; the value obtained (161 ± 0.33 mg KOH.g⁻¹ fat) is lower when compared with that reported in Kibangou variety, 207,5 mg KOH.g⁻¹ fat (Nzikou *et al.*, 2010) and Manila variety 201.33 mg KOH.g⁻¹ fat (Bustamante *et al.*, 2010).

The peroxide value (2.6 ± 0,1 meq O₂.kg⁻¹) and the melting temperature (21.5 ± 0.2 °C) obtained are lower when compared with those reported for the Alphonso variety, 7.5 meq O₂.kg⁻¹ and 38.3 °C, respectively (Gutiérrez *et al.*, 2015).

The fatty acid composition (Table 4) of the oil extracted from the Tommy Atkins mango almond, showed a high content of stearic acid (40.4 ± 0,01 g.100 g⁻¹), which was higher than that obtained by Lieb *et al.* (2019) in mango of the same variety (38.5 ± 3.0 g.100 g⁻¹). The palmitic acid content (12.0 ± 0.01 g.100 g⁻¹) is higher than that reported by Hernández *et al.* (2016) in the Rosa (6.17 g.100 g⁻¹) and Lorito (8,27 g.100 g⁻¹) varieties.

The oleic acid content was similar to obtained in the stearins of the Kent and Keitt varieties (33.5 g.100 g⁻¹), as reported by Bustamante *et al.* (2010); however, this value was lower than that obtained in the Tommy Atkins variety (44 ± 1.7 g.100 g⁻¹) according to the published by Lieb *et al.* (2019).

de índice de yodo revelan una menor resistencia a la oxidación conduciendo así a una menor vida útil del aceite (Kittiphoom, 2012).

The content of linoleic acid (8.1 g.100 g⁻¹) was higher than the value reported by Lieb (2019) for the oil obtained from the Keiit (6,0 g.100 g⁻¹)

Cuadro 3: Características físicas y químicas del aceite de almendra de mango de la variedad Tommy Atkins.

Table 3: Physical and Chemical Characteristics of Tommy Atkins Mango Almond Oil.

Parámetros	Aceite de almendra de mango variedad Tommy Atkins
Densidad (g.mL ⁻¹)	0,9 ± 0,01
Acidez (%)	1,6 ± 0,2
Índice de yodo(% yodo absorbido)	94,2 ± 0,01
Índice de saponificación (mg OH.g ⁻¹ de grasa)	161 ± 0,33
Índice de peróxidos (meq O ₂ .kg ⁻¹)	2,6 ± 0,1
Punto de fusión (°C)	21,5 ± 0,2

*Todos los valores fueron medidos por triplicado y expresan la media ± desviación estándar.

*All values were measured in triplicate and express the mean ± standard deviation.

El índice de saponificación representa la masa molecular promedio de las grasas y demuestra la calidad del aceite para el consumo humano, el valor obtenido (161 ± 0,33 mg KOH.g⁻¹ de grasa) es menor al compararlo con lo reportado en mangos variedad Kibangou 207,5 mg KOH.g⁻¹ de grasa (Nzikou *et al.*, 2010) y Manila 201,33 mg KOH.g⁻¹ de grasa (Bustamante *et al.*, 2010).

Los valores de índice de peróxidos (2,6 ± 0,1 meq O₂.kg⁻¹) y la temperatura de fusión (21,5 ± 0,2°C) obtenidos, son menores al compararlo con los reportados para la variedad Alphonso, 7,5 meq O₂.kg⁻¹ y 38,3°C, respectivamente (Gutiérrez *et al.*, 2015).

and Palmero (5,7 g.100 g⁻¹) varieties.

The ratio of saturated and unsaturated fatty acids of the almond indicates a higher proportion of saturated fats (55.55 ± 0.21 g.100 g⁻¹) compared to the unsaturated (43.98 ± 0.92 g.100 g⁻¹). Despite the small differences obtained in the proportions, it is evident that Tommy Atkins mango almonds can be considered a useful source of edible natural fats, because they do not contain trans fatty acids that affect health (Jahurul *et al.*, 2015).

Assessment of sensory acceptability

Figure 1 shows the values obtained for each attribute measured in the sensory evaluation of pastry products

En lo que se refiere a la composición de ácidos grasos (Cuadro 4) presente en el aceite extraído de la almendra de mango variedad Tommy Atkins, se determinó un alto contenido de ácido esteárico ($40,4 \pm 0,01 \text{ g.100g}^{-1}$), mayor al obtenido por Lieb *et al.* (2019) en mango de la misma variedad ($38,5 \pm 3,0 \text{ g.100 g}^{-1}$). El contenido de ácido palmítico ($12,0 \pm 0,01 \text{ g.100 g}^{-1}$) es mayor al reportado por Hernández *et al.* (2016) en mango variedades Rosa ($6,17 \text{ g.100 g}^{-1}$) y Lorito ($8,27 \text{ g.100 g}^{-1}$).

El contenido de ácido oleico obtenido presenta valores similares para las estearinas de las variedades Kent y Keitt ($33,5 \text{ g.100 g}^{-1}$), reportado por Bustamante *et al.* (2010) y menor al obtenido en mango variedad Tommy Atkins ($44 \pm 1.7 \text{ g.100 g}^{-1}$) publicado por Lieb *et al.* (2019).

Se obtuvo un contenido de ácido linoleico (8.1 g.100 g^{-1}), mayor al valor reportado por Lieb (2019) para el aceite obtenido en las variedades Keitt (6.0 g.100 g^{-1}) y Palmero (5.7 g.100 g^{-1}).

La relación de ácidos grasos saturados / insaturados obtenidos de la almendra de las semillas de mango, indican una mayor proporción de grasas saturadas ($55.55 \pm 0.21 \text{ g.100 g}^{-1}$) que de insaturadas ($43.98 \pm 0.92 \text{ g.100 g}^{-1}$). A pesar de las pequeñas diferencias obtenidas en las proporciones, es evidente que las almendras de mango variedad Tommy Atkins, pueden ser consideradas una fuente útil de grasas naturales comestibles, debido a que no contiene ácidos grasos trans que afecten la salud (Jahurul *et al.*, 2015).

made with commercial oil versus those made with mango almond oil. The pastry product with the highest sensory acceptance in terms of smell was Genovese prepared with commercial oil, followed by chocolate ganache, representing 80 and 76 %, respectively, of the evaluation panel.

The product with the lowest sensory acceptance was the chocolate biscuit prepared with both commercial oil (8 %) and mango almond oil (4 %). The panelists commented that it was possible to perceive a strong and penetrating smell in the preparations where mango almond oil was used; this observation is attributable to the chemical reactions of this oil with the other ingredients of the preparation, such as sugar and cocoa (Surco and Alvarado; 2011).

Genovese prepared with commercial oil presented greater sensory acceptance in terms of color, representing 64 %, followed by chocolate ganache made with mango almond oil (60 %), and in a third place, the chocolate biscuit prepared with both oils, representing 56 % of the total of evaluators panelists.

On the other hand, Genovese and chocolate truffles prepared with commercial oil showed good acceptance in terms of their flavor, with a value of 68 % for both products, followed by chocolate truffles prepared with mango almond oil (50 %).

The texture is another determining factor in the preparations, since the fat content used in the preparation can generate a greater softness or hardness in the product (Sogi *et al.*, 2013). Genovese and chocolate

Cuadro 4: Composición de ácidos grasos presentes en el aceite de almendra de mango variedad Tommy Atkins.**Table 4: Composition of the fatty acids in Tommy Atkins mango almond oil.**

Ácido graso	Aceite de almendra de mango variedad Tommy Atkins (g.100 g ⁻¹)
Ácido Palmítico (C16:0)	12,0 ± 0,01
Ácido Esteárico (C18:0)	40,4 ± 0,01
Ácido Oleico (C18:1)	33,6 ± 0,02
Ácido Linoleico (C18:2)	8,1 ± 0,2
Ácido Linolénico (C18:3)	1,6 ± 0,02
Ácido Araquídico (C20:0)	3,0 ± 0,04
Total saturados	55,55 ± 0,21
Total monoinsaturados	33,6 ± 0,02
Total poliinsaturados	9,92 ± 0,44
Total insaturados	43,98 ± 0,92

*Todos los valores fueron medidos por triplicado ± desviación estándar expresados en porcentaje (%).

*All values were measured in triplicate ± standard deviation expressed in percentage (%).

Evaluación de la aceptabilidad sensorial

En la figura 1 se muestra los puntajes obtenidos para cada atributo medido en la evaluación sensorial de los productos de repostería elaborados con aceite comercial versus los preparados con aceite de almendra de mango. El producto de repostería con mayor aceptación sensorial en cuanto al atributo de olor, es la genovesa preparada con aceite comercial seguido del ganache de chocolate, representando el 80 %, equivalente a 40 personas del panel evaluador y el 76 %, respectivamente.

El producto con menor aceptación sensorial es el biscuit de chocolate para ambas preparaciones con aceite comercial (8 %) y aceite de almendra de mango (4 %), los panelistas comentaron

truffles made with commercial oil showed the highest acceptance (80 and 68 %, respectively), followed by chocolate truffles made with mango almond oil (64 %). Similar results were reported by Bustamante *et al.* (2010), in covered and filled with chocolate. Additionally, the authors point out that mango almond oil is a useful substitute in the preparation of such products.

Conclusions

The characterization of the oil obtained from the mango almond, presented fatty acids free of trans fats, with an important nutritional contribution and useful for the elaboration of pastry products. The product prepared with commercial oil

que se lograba percibir un olor fuerte, penetrante, en las preparaciones donde se utilizó aceite de almendra de mango, está observación es atribuible a las reacciones químicas del aceite con los demás ingredientes como el azúcar y el cacao en la preparación (Surco y Alvarado; 2011).

that presented the greatest sensory acceptance is Genovese. Ganache and chocolate truffles were the products with the highest sensory acceptance when using mango almond oil. Despite the sensory differences found in pastry products, the oil from the mango almond turned out to be a

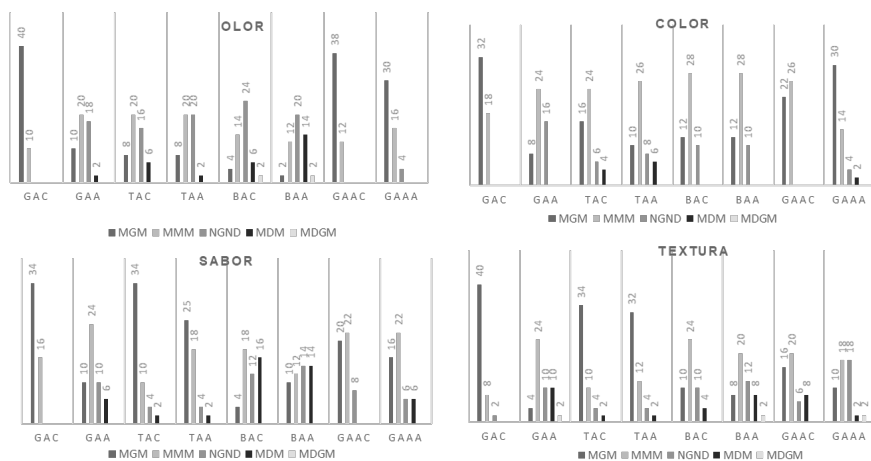


Figura 1: Evaluación sensorial de productos de repostería elaborados con aceite comercial y aceite de almendra de mango variedad Tommy Atkins. GAC: genovese con aceite comercial, GAA: genovese con aceite de almendra; TAC: trufas con aceite comercial, TAA: trufas con aceite almendra; BAC: biscuit con aceite comercial; BAA: biscuit con aceite de almedra; GAAC: ganache con aceite comercial; GAAA: ganache con aceite almendra. MGM (5): me gusta mucho, MMM (4): me gusta moderadamente; NGND (3): ni me gusta ni me disgusta; MDM (2): me disgusta moderadamente; MDGM (1): me disgusta mucho.

Figure 1: Sensory evaluation of confectionery products made with commercial oil and Tommy Atkins mango almond oil. GAC: Genovese with commercial oil; GAA: Genovese with mango almond oil; TAC: truffles with commercial oil; TAA: truffles with mango almond oil; BAC: biscuit with commercial oil; BAA: biscuit with mango almond oil; GAAC: commercial oil ganache; GAAA: ganache with mango almond oil; MGM (5): I like it a lot; MMM (4): I like it moderately; NGND (3): I don't like it, I don't dislike it either; MDM (2): I moderately dislike him; MDGM (1): I really dislike it.

La genovesa preparada con aceite comercial presentó mayor aceptación sensorial en cuanto al color, representando el 64 %, seguido del ganache de chocolate elaborado con aceite de almendra de mango (60 %) y en un tercer lugar el biscuit de chocolate para ambas preparaciones representando el 56 % del total de los panelistas evaluadores.

Por otro lado, la genovesa y las trufas de chocolate preparadas con aceite comercial presentaron buena aceptación sensorial del sabor con un valor de (68 %) para ambos productos, seguidos de las trufas de chocolate preparadas con aceite de almendra de mango (50 %).

La textura es otro factor determinante en las preparaciones debido a que el contenido de grasa utilizadas en la elaboración puede generar una mayor suavidad o una mayor dureza en el producto (Sogi *et al.*, 2013). La genovesa y las trufas de chocolate elaboradas con aceite comercial, presentaron mayor aceptación (80 %) y (68 %), respectivamente, seguido de las trufas de chocolate preparadas con aceite de almendra de mango (64 %). Resultados similares fueron reportados por Bustamante *et al.* (2010), en cubiertas y rellenos de chocolate. Adicionalmente, los autores señalan que el aceite de la almendra de mango es un sustituto útil en la preparación de dichos productos.

Conclusiones

La caracterización del aceite obtenido, presentó ácidos grasos libres

good option for making ganache and chocolate truffles in terms of texture and color.

Acknowledgments

To the Uniagustiana University for the financing of the INV-2018P-81 Project "Use of the Tommy Atkins mango seed (*Mangifera indica* L.) in fresh and decomposing state, for the production of oil as a partial substitute for trans fats in the process of making pastry products". To the Nueva Granada Military University for facilitating the use of the equipment for extracting the oil from mango almonds.

End of English Version

de grasas trans, siendo importante en el aporte nutricional y útil para la elaboración de productos de repostería. El producto preparado con aceite comercial que presentó mayor aceptación sensorial es la genovesa. El ganache y las trufas de chocolate son los productos con mayor aceptación sensorial al ser elaborados con aceite de almendras de mango. A pesar de las diferencias sensoriales encontradas en los productos de repostería, el aceite proveniente de la almendra de mango resultó ser una buena opción para la elaboración de ganache y trufas de chocolate en cuanto a la textura y el color.

Agradecimientos

A la Universitaria Uniagustiana por el financiamiento del Proyecto INV-2018P-81, titulado

aprovechamiento de la semilla de mango Tommy (*Mangifera indica* L.) en estado fresco y en descomposición para la elaboración de aceite como sustituto parcial de grasas trans en el proceso de elaboración de productos de repostería. A la Universidad Militar Nueva Granada por facilitar el uso de los equipos para la extracción del aceite de las almendras de mango.

Literatura citada

- AACC International approved methods. 2001. AACC 08-01, Ash-Basic Method. American association of cereal chemists.
- AOAC, Official methods of Analysis. 2000. Washington. Association of Official Analytical Chemists, (16th Ed.).
- AOAC, Official Methods of Analysis. 2000. Oficial method 948.22. Fat (crude) in nuts and nut products.
- Bustamante, SP., G. Vilchis, C. Álvarez, M. Trejo. 2010. Caracterización del aceite obtenido de almendras de diferentes variedades de mango y su aplicación como sustituto de manteca de cacao en rellenos y coberturas de chocolate. Revista electrónica Respyn. Disponible en: <http://www.respyn.unal.mx/especiales/2008/ee-08-2008/.../A068.pdf>, Fecha de consulta: septiembre 2010.
- Carpenter, R., D. Lyon, T. Hasdell. 2009. Análisis sensorial en el desarrollo y control de la calidad de alimentos. Editorial acribia, 2009. 15 pp. isbn 978-84-200-0988-9.
- Corpoica; Asohofrucol. 2013. Modelo Tecnológico para el cultivo del mango en el Valle del alto Magdalena en el Departamento del Tolima Asohofrucol. Disponible: http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_264_MP_Mango.pdf.
- Corrales, A., M. Maldonado, L. Urango, M. Franco, B. Rojano. 2014. Mango de azúcar (*Mangifera indica* L.), variedad de Colombia: características antioxidantes, nutricionales y sensoriales. Rev. Chilena de Nutrición. 41(3): 312-318. Disponible: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182014000300013>
- Departamento administrativo Nacional de Estadística (DANE). 2020. Encuesta nacional agropecuaria (ENA) 2019-I. Boletín técnico, (1):1-38.
- Food and Agriculture Organization. 2018. Disponible: <http://www.fao.org/3/ca5692es/CA5692ES.pdf>
- Fowomola, M. 2010. Some nutrients and antinutrients contents of mango (*Mangifera indica*) seed. African Journal of Food Science. 4(8): 472 – 476.
- Gisslen, W. 2014. Panadería y Pastelería para Profesionales. Editorial Limusa S.A. México D.F.
- Gutiérrez, C., Y. Rivera, R. Gómez, V. Bastidas, C. Izaguirre. 2015. Extracción y caracterización de grasa y almidón de la almendra de mango variedad Alphonso (*Mangifera indica* L.). Rev. Fac Farm. 57(2):32-42.
- Hernández, M., A. Sandoval, J. Montoya. 2016. Características fisicoquímicas de la grasa de semilla de veinte cultivares de mango (*Mangifera indica* L.) en Colombia. Revista Brasileira de Fruticultura, 38(1):10-21. Disponible: <https://doi.org/10.1590/0100-2945-297/14>
- International Organization for Standardization. 2009. ISO 1871 - Food and feed products-General guidelines for the determination of nitrogen by the Kjeldahl method”, 2da edition.
- Jahurul, M., I. Zaidul, G. Kashif, Y. Fahad, F. Al-Juhaimi, K. Nyam, N. Norulaini, F. Sahena, A. Mohd. 2015. Mango (*Mangifera indica* L.) by-products and their valuable components: a review. Food Chem 183:173-180. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.046>




- Kittiphoom, S. 2012. Utilization of Mango seed. *International Food Research Journal*, 19(4): 1325-1335.
- Lieb, V. M., L. Schuster, A. Kronmülle, H. Schmarr, R. Carle; C. Steingass. 2019. Fatty acids, triacylglycerols, and thermal behaviour of various mango (*Mangifera indica* L.) kernel fats. *Rev. Food. Research. Inter.* 116: 527-537. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.070>
- Muchiri, D., S. Mahunga, S. Gituanja. 2012. Studies on mango (*Mangifera indica* L.) kernel fat of some Kenyan varieties in Meru. *Journal of the American oil Chemist's society*,89(9): 1567-1575.
- Nzikou, J., A. Kimbonguila, L. Matos, B. Loumouamou, NP. G. Pambou-Tobi, C. B. Ndangui, A. A. Abena, Th. Silou, J. Scher, y S. Desobry. 2010. Extraction and characteristics of seed kernel oil from mango (*Mangifera indica* L.). *Res. J. Envir. Earth Sci.* 2(1): 31-35.
- Norma técnica colombiana 668.1973 Alimentos y materias primas. Determinación de contenidos de grasa y fibra cruda.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. Food Science Evaluation of the AOAC 985-29. 2003. Enzimic gravimetric method for determination of dietary fiber in oat and corn grains. Vol. 53.
- Sogi, D., M. Siddiq, I. Greiby, K. Dolan. 2013. Total phenolics, antioxidant activity, and functional properties of 'Tommy Atkins' mango peel and kernel as affected by drying methods. *Food Chem.* 141: 2649-2655. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.053>
- Sumaya, M., L. Sánchez, M. Torres, G. D. García. 2012. Red de Valor del Mango y Sus Desechos Con Base en Las Propiedades Nutricionales y Funcionales, *Revista Mexicana de Agronegocios*, pp. 826.
- Surco, J. C., J.A. Alvarado. 2011. Estudio estadístico de pruebas sensoriales de harinas compuestas para panificación. *Revista Boliviana de Química*, 28 (2): 79-82. ISSN: 0250-5460. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=4263/426339676005>
- Tapia, M., B. Pérez, J. Cavazos, M. Mayett. 2013. Obtención de aceite de semilla de mango manila (*Mangifera indica* L.) como una alternativa para aprovechar subproductos agroindustriales en regiones tropicales. *Revista mexicana de agronegocios Sexta Época.* 32: 258-266.

Frutos nativos de Perú como fuente potencial de nutrientes, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en el requerimiento nutricional de grupos vulnerables

Native fruits of Peru as a potential source of nutrients, bioactive compounds and antioxidant capacity in the nutritional requirements of vulnerable groups

Frutas nativas do Peru como fonte potencial de nutrientes, compostos bioativos e capacidade antioxidante nas necessidades nutricionais de grupos vulneráveis

Antonio José Obregón La Rosa^{1*}, Garbiña Anadeira Talledo Rodríguez¹ y Rember Emilio Pinedo Taco²

¹Escuela de Ciencia de Alimentos, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Correo electrónico: (AO): aobregonl@unmsm.edu.pe, ; (GT) gabytalledo@yahoo.es, . ²Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de agronomía. Departamento de Fitotecnia, Lima, Perú. Correo electrónico: rpinedo@lamolina.edu.pe, .

Resumen

La región andina posee una gran variedad de especies nativas, que pueden satisfacer una gran parte de los requerimientos nutricionales diarios, necesarios para poblaciones vulnerables, debido al alto contenido de nutrientes que estos poseen. En este trabajo se realizó la caracterización fisicoquímica de tres tipos de frutos nativos provenientes de la región andina del Perú: Aguaymanto (*Physalis peruviana*), pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) y quito quito (*Solanum quitoense*), se evaluó el potencial de nutrientes, los compuestos bioactivos, la capacidad antioxidante y se comparó con el requerimiento nutricional de grupos vulnerables (adultos mayores, madres gestantes y madres en período de lactancia). Para cada grupo vulnerable se contrastó el aporte promedio de los frutos y el aporte promedio teórico de una dieta de cinco días con el IDR10, que representa el 10 % del requerimiento total de la Ingesta Dietética de Referencia

Recibido el 28-07-2020 • Aceptado el 08-09-2020.

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: aobregonl@unmsm.edu.pe

(IDR) considerando que el consumo de los frutos representa un 10 % de la ingesta total de alimentos por día. Para comprobar la hipótesis se determinó un índice global como una función de deseabilidad, determinado a partir de la media geométrica de los índices de compuestos físico-químicos, nutricionales, bioactivos y capacidad antioxidante de los frutos estudiados. Se utilizó el método estadístico no paramétrico de Kruskal Wallis con un nivel significativo de 5 %, constatando significativamente ($p \leq 0,05$) que el contenido de los componentes de los frutos nativos representa una fuente potencial de nutrientes, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en el requerimiento nutricional de grupos vulnerables.

Palabras clave: Compuestos fenólicos, estrés oxidativo, malnutrición, requerimiento nutricional.

Abstract

The Andean region has a great variety of native species, which can satisfy a large part of the daily nutritional requirements, necessary for vulnerable populations, due to their high nutrient content. In this work, the physicochemical characterization of three types of native fruits from the Andean region of Peru was carried out: Aguaymanto (*Physalis peruviana*), yellow pitahaya (*Selenicereus megalanthus*) and Quito (*Solanum quitoense*), the potential of nutrients, the bioactive compounds, antioxidant capacity and was compared with the nutritional requirement of vulnerable groups (older adults, pregnant mothers and lactating mothers). For each vulnerable group, the average contribution of the fruits and the theoretical average contribution of a five-day diet were contrasted with the IDR10, which represents 10 % of the total requirement of the Dietary Reference Intake (IDR) considering that the consumption of the fruit represents 10 % of the total food intake per day. To test the hypothesis, a global index was determined as a function of desirability, determined from the geometric mean of the indices of physical-chemical, nutritional, bioactive compounds and antioxidant capacity of the studied fruits. The non-parametric statistical method of Kruskal Wallis was used with a significant level of 5 %, significantly verifying ($p \leq 0.05$) that the content of the components of the native fruits represent a potential source of nutrients, bioactive compounds and antioxidant capacity in the nutritional requirements of vulnerable groups.

Keywords: Phenolic compounds, oxidative stress, malnutrition, nutritional requirement.

Resumo

A região andina possui uma grande variedade de espécies nativas, que podem satisfazer grande parte das necessidades nutricionais diárias, necessárias para populações vulneráveis, devido ao seu alto teor de nutrientes. Neste trabalho foi realizada a caracterização físico-química de três tipos de frutas nativas da

região andina do Peru: Aguaymanto (*Physalis peruviana*), Pitahaya amarela (*Selenicereus megalanthus*) e Quito (*Solanum quitoense*), o potencial de nutrientes, a compostos bioativos, capacidade antioxidante e foi comparada com a necessidade nutricional de grupos vulneráveis (idosos, mães grávidas e lactantes). Para cada grupo vulnerável, a contribuição média das frutas e a contribuição média teórica de uma dieta de cinco dias foram contrastadas com a IDR10, que representa 10 % da necessidade total da Ingestão Dietética de Referência (IDR) considerando que o consumo da frutas representam 10% da ingestão total de alimentos por dia. Para testar a hipótese, foi determinado um índice global em função da desejabilidade, determinado a partir da média geométrica dos índices físico-químicos, nutricionais, compostos bioativos e capacidade antioxidante dos frutos estudados. Foi utilizado o método estatístico não paramétrico de Kruskal Wallis com nível de significância de 5 %, verificando significativamente ($p \leq 0,05$) que os conteúdos dos componentes dos frutos nativos representam uma fonte potencial de nutrientes, compostos bioativos e capacidade antioxidante nas necessidades nutricionais de grupos vulneráveis.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, estresse oxidativo, desnutrição, exigência nutricional.

Introducción

El Perú, posee diversas especies nativas, esta megadiversidad se debe a la presencia de la Cordillera de los Andes, siendo unos de los centros más importantes de recursos genéticos, conocidos como Centros de Vavilov, por el alto número de especies domesticadas y variedad de ecosistemas (Mostacero *et al.*, 2017; Campos *et al.*, 2018; Bravo *et al.*, 2016). En esta región, existen diversas frutas nativas que poseen nutrientes esenciales para la salud pública, las cuales han sido poco estudiadas (Campos *et al.*, 2018). Destacan los frutos nativos como el aguaymanto, el sanky, la pitahaya, la chirimoya, la lúcuma entre otros, los que son más sabrosos que los frutos tradicionales y además presentan propiedades nutricionales beneficiosas para la salud (Blanco de Alvarado, 2016).

Introduction

Peru has several native species, this megadiversity is due to the presence of the Andes Mountains, being one of the most important centers of genetic resources, known as Vavilov Centers, due to the high number of domesticated species and variety of ecosystems (Mostacero *et al.*, 2017; Campos *et al.*, 2018; Bravo *et al.*, 2016). In this region, there are several native fruits that have essential nutrients for public health, which have been little studied (Campos *et al.*, 2018). Native fruits such as aguaymanto, sanky, pitahaya, custard apple, lucuma, among others, stand out, which are tastier than traditional fruits and have nutritional properties beneficial to health (Blanco de Alvarado, 2016).

Regarding the nutritional aspect, the high content of vitamins and

Con respecto al aspecto nutricional, el alto contenido de vitaminas y nutrientes esenciales de los frutos nativos es una alternativa para enfrentar los problemas de desnutrición y malnutrición sobre todo en sectores de poblaciones vulnerables. La desnutrición, el sobrepeso y obesidad (conocida como la malnutrición) constituyen uno de los grandes problemas que afecta principalmente a personas que tienen cierto grado de riesgo considerándose como personas vulnerables. La malnutrición trae consigo consecuencias negativas para la salud y la calidad de vida de personas en situaciones de riesgo; además de tener un impacto negativo a nivel económico y social (Curi-Quinto *et al.*, 2019; Nugent *et al.*, 2020).

El consumo de frutas y verduras, proporcionan nutrientes que ayudan en el requerimiento nutricional de grupos vulnerables como niños, adultos mayores, madres en periodos de lactancia, entre otros (Pennington y Fisher, 2010). Los frutos poseen compuestos bioactivos como polifenoles, carotenoides, flavonoides, fibra, vitaminas, minerales y péptidos bioactivos, los que están relacionados con el tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas (Martínez *et al.*, 2008; Septembre-Malaterre *et al.*, 2018; Dos Santos *et al.*, 2015). Estas sustancias actúan en la degradación oxidativa de los radicales libres, responsables de la generación de este tipo de enfermedades (Costa *et al.*, 2013; Guerreo-Ochoa *et al.*, 2015).

Diversos estudios indican que los compuestos bioactivos presentes

essential nutrients of native fruits is an alternative to face the problems of malnutrition, especially in sectors of vulnerable populations. Malnutrition, overweight and obesity constitute one of the great problems that mainly affects people who have a certain degree of risk and are considered vulnerable. Malnutrition brings with its negative consequences for the health and quality of life of people at risk; in addition to having a negative economic and social impact (Curi-Quinto *et al.*, 2019; Nugent *et al.*, 2020).

The consumption of fruits and vegetables provide nutrients that help in the nutritional requirements of vulnerable groups such as children, the elderly, mothers in lactation periods, among others (Pennington y Fisher, 2010). The fruits have bioactive compounds such as polyphenols, carotenoids, flavonoids, fiber, vitamins, minerals and bioactive peptides, which are related to the treatment of chronic degenerative diseases (Martínez *et al.*, 2008; Septembre-Malaterre *et al.*, 2018; Dos Santos *et al.*, 2015). These substances act in the oxidative degradation of free radicals, responsible for the generation of this type of disease (Costa *et al.*, 2013; Guerreo-Ochoa *et al.*, 2015).

Various studies indicate that the bioactive compounds present in the fruits are recommended in public health as antidiabetic, anticancer, antihypertensive, neuroprotective, anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, antiviral, stimulation of the immune system, in cellular

en los frutos se recomiendan en salud pública como antidiabéticos, anticancerosos, antihipertensivos, neuroprotectores, antiinflamatorios, antioxidantes, antimicrobianos, antivirales, estimulación del sistema inmunológico, en desintoxicación celular, en la síntesis de colesterol, anticonvulsivantes y su capacidad para disminuir la presión arterial (Karasawa y Mohan, 2018).

Sin embargo, la enorme riqueza de los frutos nativos, no es aprovechada eficientemente, existiendo escasa información sobre el aporte de los compuestos nutricionales y bioactivos de los frutos nativos sobre los requerimientos nutricionales diarios de grupos vulnerables, como ancianos, madres gestantes y madres en período de lactancia, etc. Según Contiente y Bellido (2006) en el mundo mueren 57 millones de personas al año, principalmente por enfermedades crónicas degenerativas no transmisibles que representan las dos terceras partes de estas muertes y del 46 % de la morbilidad a nivel mundial.

En los últimos años, se investiga el papel que desempeñan los antioxidantes presentes en los vegetales en la reducción de enfermedades cardiovasculares, en numerosos tipos de cáncer, en el SIDA e incluso en otras enfermedades directamente asociadas con el proceso de envejecimiento, como son las cataratas o las enfermedades degenerativas del sistema nervioso, ocasionadas por los radicales libres (Martínez *et al.*, 2008; Karasawa y Mohan, 2018).

detoification, in the synthesis of cholesterol, anticonvulsant and its ability to lower blood pressure (Karasawa y Mohan, 2018).

However, the enormous wealth of native fruits is not used efficiently, there is little information on the contribution of nutritional and bioactive compounds of native fruits on the daily nutritional requirements of vulnerable groups, such as the elderly, pregnant mothers and mothers in period breastfeeding, etc. According to Contiente and Bellido (2006), 57 million people die a year in the world, mainly from chronic degenerative non-communicable diseases that account for two thirds of these deaths and 46 % of morbidity worldwide.

In recent years, the role of antioxidants present in vegetables has been investigated in reducing cardiovascular diseases, numerous types of cancer, AIDS and even other diseases directly associated with the aging process, such as cataracts. or degenerative diseases of the nervous system, caused by free radicals (Martínez *et al.*, 2008; Karasawa y Mohan, 2018).

Therefore, native fruits represent a potential source of nutrients and bioactive compounds (Septembre *et al.*, 2018; Shashirekha *et al.*, 2015), and there is enormous interest in knowing what is the contribution of these components in the diet of vulnerable groups.

For this reason, the present investigation was proposed to evaluate the potential of nutrients, bioactive compounds and antioxidant capacity of three types of fruits from the

Por lo señalado, las frutas nativas representan una fuente potencial de nutrientes y de compuestos bioactivos (Septembre *et al.*, 2018; Shashirekha *et al.*, 2015), existiendo un enorme interés por conocer cuál es el aporte de dichos componentes en la dieta de grupos vulnerables.

Por tal razón, se planteó la presente investigación cuyo objetivo fue evaluar el potencial de nutrientes, los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de tres tipos de frutos provenientes de la región andina del Perú: Aguaymanto (*Physalis peruviana*), pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) y quito quito (*Solanum quitoense*), y se comparó con el requerimiento nutricional de grupos vulnerables (adultos mayores, madres gestantes y madres en periodo de lactancia).

Materiales y métodos

Ubicación del ensayo

El estudio se realizó en dos etapas. La primera etapa consistió en obtener vía colecta los frutos nativos. Los frutos se colectaron de la zona andina y de la selva central del Perú durante los meses de enero a marzo de 2019. El Aguaymanto provino de la región andina central (Ayacucho); la pitahaya de la selva norte peruana (Ucayali) y el quito quito de la provincia de Oxapampa, Pasco. La segunda etapa, se ejecutó en los laboratorios de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El experimento se ejecutó durante los meses de enero a julio de 2019. Se muestrearon al azar 50 kg

Andean region of Peru: Aguaymanto (*Physalis peruviana*), yellow pitahaya (*Selenicereus megalanthus*) and Quito Quito (*Solanum quitoense*), and it was compared with the nutritional requirement of vulnerable groups (older adults, pregnant mothers and lactating mothers).

Materials and methods

Trial location

The study was carried out in two stages. The first stage consisted of obtaining the native fruits via the collection. The fruits were collected from the Andean zone and the central jungle of Peru during the months of January to March 2019. The Aguaymanto came from the central Andean region (Ayacucho); the pitahaya from the northern Peruvian jungle (Ucayali) and the quito quito from the province of Oxapampa, Pasco. The second stage was carried out in the laboratories of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos. The experiment was run from January to July 2019. Approximately 50 kg of each fruit were randomly sampled from plants with the best phenotype, dividing into 5 batches of 10 kg, expressing the results as the mean of each batch ($n = 5$). The fruits were washed, ground and lyophilized and kept at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for their respective analyzes.

Physicochemical analysis

The fiber content was determined by acid and alkaline digestion and the total carbohydrates by difference, subtracting from 100 the sum of the

aproximadamente de cada fruto, de plantas de mejor fenotipo, dividiéndose en 5 lotes de 10 kg, expresando los resultados como la media de cada lote ($n = 5$). Las frutas fueron lavadas, molidas y liofilizadas y mantenidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para sus análisis respectivos.

Análisis físico-químicos

Se determinó el contenido de fibra mediante una digestión ácida y alcalina y los carbohidratos totales por diferencia, restando de 100 la suma de los porcentajes de agua, proteína bruta, cenizas y extracto etéreo (AOAC, 2012).

El contenido de minerales se determinó en muestras de cenizas obtenidas en una mufla a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente disueltas en HCl. Los extractos de minerales se midieron utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer modelo 3030-B). El magnesio (Mg), cobre (Cu) y hierro (Fe) fueron determinados por Espectrometría de Absorción Atómica con Llama (FAAS) y el potasio (K) por espectrometría de Emisión Atómica con Llama (FAES). Para cada mineral se preparó una curva estándar y un blanco respectivo. El contenido de fósforo (P) fue medido utilizando la técnica espectrofotométrica con azul de molibdeno (AOAC, 2012).

Determinación de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante

El contenido de vitamina C (Ácido ascórbico), se determinó mediante el método modificado de titulación con 2,6 diclorofenol indofenol que utiliza ácido oxálico en lugar de ácido metafosfórico durante la extracción,

percentajes of water, crude protein, ash and ethereal extract (AOAC, 2012).

The mineral content was determined in ash samples obtained in a muffle at $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ and subsequently dissolved in HCl. Mineral extracts were measured using an atomic absorption spectrophotometer (Perkin Elmer model 3030-B). Magnesium (Mg), copper (Cu) and iron (Fe) were determined by Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS) and potassium (K) by Flame Atomic Emission Spectrometry (FAES). For each mineral, a standard curve and a respective blank were prepared. The content of phosphorus (P) was measured using the spectrophotometric technique with molybdenum blue (AOAC, 2012).

Determination of bioactive compounds and antioxidant capacity

The content of vitamin C (ascorbic acid) was determined by the modified titration method with 2,6 dichlorophenol indophenol that uses oxalic acid instead of metaphosphoric acid during extraction, as recommended by Benassi and Antunes (1988).

Determination of phenolic compounds

For the extraction of phenolic compounds, 0.5 g of lyophilized pulp of each previously homogenized fruit was weighed and 5 mL of $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/$ formic acid solution (24:25:1 % v/v) was added. Subsequently, the sample was extracted in an ultrasound (Sonorex brand, model RK512H) for one hour, then the samples were left to rest

según lo recomendado por Benassi y Antunes (1988).

Determinación de compuestos fenólicos

Para la extracción de los compuestos fenólicos, se pesaron 0,5 g de pulpa liofilizada de cada fruto previamente homogenizada y se agregó 5 mL de solución de H₂O/MeOH/ac.fórmico (24:25:1 % v/v). Posteriormente se procedió a la extracción de la muestra en un ultrasonido (marca Sonorex, modelo RK512H) por una hora, seguidamente, las muestras se dejaron reposar por 24 horas tapadas en refrigeración. Después, las muestras se sometieron nuevamente a extracción en el ultrasonido por una hora, seguidamente se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min, se filtraron y el líquido filtrado (extracto) fue recolectado para los correspondientes análisis de fenoles y capacidad antioxidante (Romero *et al.*, 2019).

La determinación de compuestos fenólicos se realizó con el método de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton y Rosi (1965), partiendo de una curva estándar de ácido gálico (de 0,05 a 1 g ácido gálico.L⁻¹) expresando los resultados como equivalentes de ácido gálico en mg. 100 g⁻¹ de muestra. Se realizaron mediciones de absorbancia a 765 nm, empleando un espectrofotómetro marca Hitachi U-2800 A (Tokyo, Japón).

Capacidad antioxidante mediante el método ABTS

El ensayo de ABTS fue realizado según lo descrito por Re *et al.* (1999), utilizando el mismo extracto que para la determinación de polifenoles totales. Se preparó una curva estándar

for 24 hours covered in refrigeration. Afterwards, the samples were again subjected to extraction in ultrasound for one hour, then they were centrifuged at 3500 rpm for 15 min, they were filtered, and the filtered liquid (extract) was collected for the corresponding analyzes of phenols and antioxidant capacity (Romero *et al.*, 2019).

The determination of phenolic compounds was carried out with the Folin-Ciocalteu method, described by Singleton and Rosi (1965), starting from a standard curve of gallic acid (from 0.05 to 1 g gallic acid.L⁻¹) expressing the results as gallic acid equivalents in mg. 100 g⁻¹ sample. Absorbance measurements were made at 765 nm, using a Hitachi U-2800 A (Tokyo, Japan) brand spectrophotometer.

Antioxidant capacity using the ABTS method

The ABTS assay was performed as described by Re *et al.* (1999), using the same extract as for the determination of total polyphenols. A standard curve of 5 to 0.5 mM of trolox was prepared in Buffer PBS (phosphate saline). The generation of the ABTS + radical was obtained by reaction of 7 mM ABTS with 2.45 mM potassium persulfate, incubated at room temperature and in the dark for 16 hours. The ABTS + radical formed was diluted with PBS buffer to obtain an absorbance reading at 730 nm of 0.70 ± 0.02 (approximately 1/7₅). The results were expressed in μmol trolox.100 g⁻¹ sample.

de 5 a 0,5 mM de trolox en Buffer PBS (fosfato salino). La generación del radical ABTS⁺ se obtuvo por reacción de ABTS 7 mM con persulfato potásico 2,45 mM, incubados a temperatura de ambiente y en oscuridad por 16 horas. El radical ABTS⁺ formado fue diluido con tampón PBS hasta obtener una lectura de absorbancia a 730 nm de $0,70 \pm 0,02$ (aproximadamente $1/70$). Los resultados fueron expresados en $\mu\text{mol trolox} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ muestra.

Determinación de carotenoides totales

Para la extracción de los carotenoides se pesaron 0,5 gramos de pulpa liofilizada de cada fruto, adicionando 2,5 mL de una mezcla de hexano:acetona (1:1 % v/v). Posteriormente, se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante (el residuo, de la parte inferior, fue sucesivamente extraído de la misma manera hasta que desapareció el color amarilloso). Luego se adicionaron 2,5 mL de éter de petróleo al extracto extraído y se colocó en un ultrasonido (marca Sonorex, modelo RK512H) por una (1) hora, después se lavaron los extractos con agua destilada varias veces. La determinación de los carotenoides totales se realizó midiendo la absorbancia del extracto en un espectrofotómetro (marca Hitachi U-2800 A, Tokyo, Japón) a 470 nm, partiendo de una curva estándar de β -caroteno (de 10 a 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), usando como blanco el éter de petróleo, según lo recomendado por Talcott y Howard (1999). Los resultados fueron expresados como mg de β -caroteno. 100 g^{-1} de muestra.

Determination of total carotenoids

For the extraction of the carotenoids, 0.5 grams of lyophilized pulp of each fruit were weighed, adding 2.5 mL of a mixture of hexane:acetone (1:1 % v/v). Subsequently, it was centrifuged at 3500 rpm for 15 minutes and the supernatant was collected (the residue, from the lower part, was successively extracted in the same way until the yellow color disappeared). Then 2.5 mL of petroleum ether were added to the extracted extract and it was placed in an ultrasound (Sonorex brand, model RK512H) for one (1) hour, then the extracts were washed with distilled water several times. The determination of total carotenoids was carried out by measuring the absorbance of the extract in a spectrophotometer (brand Hitachi U-2800 A, Tokyo, Japan) at 470 nm, starting from a standard curve of β -carotene (from 10 to 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), using petroleum ether as a target, as recommended by Talcott and Howard (1999). The results were expressed as mg of β -carotene. 100 g^{-1} sample.

Dietary reference intake (IDR)

The Dietary Reference Intake (RDI) requirements were used to contrast the content of the physical-chemical and nutritional components of the study fruits, based on the recommendations of the Food and Nutrition Board (National Academy of Sciences [NAS] from United States). To compare the requirements of bioactive compounds and antioxidant capacity, the recommendations of Saura-Calixto and Goñi (2006) were taken as a reference, who determined

Ingesta dietética de referencia (IDR)

Los requerimientos de Ingesta dietética de referencia (IDR), se utilizaron para las contrastaciones del contenido de los componentes físico-químicos y nutricionales de los frutos en estudio, a partir de las recomendaciones de la Food and Nutrition Board (National Academy of Sciences [NAS] de los Estados Unidos). Para comparar los requerimientos de compuestos bioactivos y de la capacidad antioxidante, se tomó como referencia las recomendaciones de Saura-Calixto y Goñi (2006), quienes determinaron los requerimientos de antioxidantes y de compuestos bioactivos de la dieta mediterránea española.

Para comparar los aportes de los componentes de los frutos estudiados con los valores de IDR recomendados, se consideró un consumo de 200 gramos de frutos por día, es decir 100 g de fruto a media mañana y 100 g a media tarde aproximadamente, que viene a representar un promedio del 10 % de la ingesta diaria total de alimento que consume una persona. Los valores del contenido de compuestos físico-químicos, nutricionales, bioactivos y capacidad antioxidante de los frutos nativos se reportaron por día de consumo. El consumo teórico de los frutos durante cinco días, se efectuó de acuerdo a lo indicado en el cuadro 1.

La IDR10 de cada grupo vulnerable estudiado fue comparada con los siguientes tratamientos:

Aporte promedio de cada fruto de forma independiente: El contenido promedio de los componentes

the requirements of antioxidants and bioactive compounds of the Spanish Mediterranean diet.

To compare the contributions of the components of the fruits studied with the recommended IDR values, a consumption of 200 g. of fruits per day was considered, that is, 100 g of fruit at mid-morning and approximately 100 g at mid-afternoon, which comes to represent an average of 10 % of the total daily food intake that a person consumes. The values of the content of physical-chemical, nutritional, bioactive compounds and antioxidant capacity of the native fruits were reported per day of consumption. The theoretical consumption of the fruits for five days was carried out according to what is indicated in table 1.

The IDR10 of each vulnerable group studied was compared with the following treatments:

- Average contribution of each fruit independently: The average content of the nutritional components of each fruit independently (aguaymanto, pitahaya and quito quito).

- Average contribution of the fruits.

- Average contribution of the diet, for a consumption of 200 g. of fruits per day for five days according to what is indicated in table 1.

Contrasting the hypotheses

The results of the treatments indicated above were used in the determination of a global index, obtained from the geometric mean of the indices of physical-chemical and nutritional compounds, bioactive compounds and antioxidant capacity for each vulnerable group analyzed, using the function of desirability.

nutricionales de cada fruto de forma independiente (aguaymanto, pitahaya y quito quito).

Aporte promedio de los frutos en su conjunto.

Aporte promedio de la dieta, para un consumo de 200 gramos de frutos diarios por cinco días de acuerdo a lo indicado en el cuadro 1.

According to Wu (2004), the global desirability was calculated with the following formula:

$$D = \sqrt[n]{d_1 x d_2 x \dots x d_n}$$

Where:

D = Global desirability

d1, d2, ..., dn = Individual

Cuadro 1. Dieta teórica propuesta de frutos nativos para grupos vulnerables.

Table 1. Proposed theoretical diet of native fruits for vulnerable groups.

Día	Fruto	Consumo (g.día ⁻¹)
1	Aguaymanto	200
2	Pitahaya	200
3	Quito Quito	200
4	Aguaymanto	200
5	Quito Quito	200

Fuente: Elaboración propia.

Source: Self made.

Contrastación de las hipótesis

Los resultados de los tratamientos indicados anteriormente se utilizaron en la determinación de un índice global, obtenido a partir de la media geométrica de los índices de compuestos físico-químicos y nutricionales, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante para cada grupo vulnerable analizado, utilizando la función de deseabilidad.

De acuerdo a Wu (2004), la deseabilidad global se calculó con la siguiente fórmula

$$D = \sqrt[n]{d_1 x d_2 x \dots x d_n}$$

Dónde: D= Deseabilidad global

desirabilities which in turn are transformations that convert the predicted values of each response.

The maximum parameter used in the research was one (1) that corresponds to the IDR10 of each component according to the vulnerable group analyzed.

Experimental design and statistical analysis of data

Descriptive statistical analysis and inferential analysis were performed to search for association or correlation. The normal distribution of the data was analyzed using the Anderson-Darling test (Gutiérrez y De la Vara, 2008). In cases where significant differences were found between

d_1, d_2, \dots, d_n = Deseabilidades individuales que a su vez son transformaciones que convierten los valores predichos de cada respuesta.

El parámetro máximo utilizado en la investigación fue de uno (1) que corresponde al IDR10 de cada componente según el grupo vulnerable analizado.

Diseño experimental y análisis estadístico de datos

Se realizó el análisis estadístico descriptivo y el análisis inferencial para la búsqueda de asociación o correlación. La distribución normal de los datos se analizó mediante la prueba de Anderson-Darling (Gutiérrez y De la Vara, 2008). En casos donde se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (IDR10 de cada grupo vulnerable, aporte promedio de los frutos de forma independiente y en su conjunto y aporte promedio de la dieta establecida), se procedió a realizar una prueba de comparación entre tratamientos, a fin de evaluar la significancia (Pedrosa *et al.*, 2015).

Resultados y discusión

Componentes físico-químicos y nutricionales

En el estudio del aporte de los componentes físico-químicos y nutricionales de los frutos nativos con relación al IDR10, para los grupos vulnerables estudiados, se demostró que en el aguaymanto, el contenido promedio de fibra, carbohidratos, fósforo y el promedio de la dieta resultaron mayores a los IDR10 del adulto mayor, madres gestantes y madres lactantes ($p \leq 0.05$) (Cuadro 2).

treatments (IDR10 of each vulnerable group, average contribution of the fruits independently and as a whole and average contribution of the established diet), a comparison test between treatments was carried out, in order to assess significance (Pedrosa *et al.*, 2015).

Results and discussion

Physical-chemical and nutritional components

In the study of the contribution of the physical-chemical and nutritional components of the native fruits in relation to the IDR10, for the vulnerable groups studied, it was shown that in the aguaymanto, the average content of fiber, carbohydrates, phosphorus and the average of the diet they were higher than the IDR10 of the elderly, pregnant mothers and lactating mothers ($p \leq 0.05$) (Table 2).

The nutritional recommendations (IDR) of the Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (2000) exceed the nutritional requirements in some cases by 20 to 30%, since these IDRs indicate the minimum amounts necessary (Cereceda, 2008).

The fiber content of the aguaymanto, quite quite, average fruit and diet were higher than the IDR10 for each vulnerable group studied. In this regard, Mesquita de Carvalho *et al.* (2019), Larrauri *et al.* (1996); Wang and Jiao (2000) Staffolo *et al.* (2004) and Ajila *et al.* (2008) point out that dietary fiber favors better glycemic control, diabetes, high cholesterol, colon cancer, and gastrointestinal and cholesterol disorders.

Cuadro 2. Aporte promedio de los componentes físico-químicos y nutricionales de los frutos nativos respecto al IDR10 en adulto mayor, madres gestantes y madres en período de lactancia.

The high content of copper and iron found in the fruits studied, cover the nutritional needs required daily only with the consumption of 100 g. of the fruits and the established diet. The fruits of aguaymanto, pitahaya and

Cuadro 2. Aporte promedio de los componentes físico-químicos y nutricionales de los frutos nativos respecto al IDR10 en adulto mayor, madres gestantes y madres en período de lactancia.

Table 2. Average contribution of the physical-chemical and nutritional components of native fruits with respect to the IDR10 in older adults, pregnant mothers and lactating mothers.

	Fibra* (g.día ⁻¹)	Carbohidratos (g.día ⁻¹)	Fósforo (mg.día ⁻¹)	Potasio (g.día ⁻¹)	Magnesio (mg.día ⁻¹)	Cobre (mg.día ⁻¹)	Hierro (mg.día ⁻¹)
IDR 10 Adulto Mayor		3,00 ^a	13,00 ^a	70,00 ^a	0,47 ^a	42,00 ^a	0,10 ^a
IDR 10 Madres gestantes		2,80 ^a	17,50 ^b	70,00 ^a	0,47 ^a	40,00 ^a	0,10 ^a
IDR 10 Madres en lactancia		2,90 ^a	21,00 ^c	70,00 ^a	0,51 ^b	36,00 ^b	0,13 ^a
Aguaymanto		5,47 ^d	32,59 ^f	93,65 ^d	0,56 ^c	43,23 ^f	1,89 ^b
Pitahaya		2,20 ^c	17,33 ^b	61,45 ^c	0,31 ^f	56,06 ^c	3,11 ^d
Quito Quito		3,74 ^b	20,56 ^c	81,13 ^c	0,71 ^e	50,15 ^c	2,38 ^c
Promedio Frutos		3,81 ^b	23,49 ^d	78,74 ^b	0,53 ^c	49,81 ^c	2,46 ^c
Promedio Dieta		4,13 ^c	24,72 ^e	82,20 ^c	0,57 ^d	48,56 ^d	2,33 ^c

*Valor medio de cinco mediciones (n=5); medias dentro de una columna con diferentes letras son significativamente diferentes a p ≤ 0,05.

*Mean value of five measurements (n = 5); means within a column with different letters are significantly different at p ≤ 0.05.

Las recomendaciones nutricionales (IDR) de la Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (2000) exceden a los requerimientos nutricionales en algunos casos en un 20 a 30 %, toda vez que estos IDRs indican las cantidades mínimas necesarias (Cereceda, 2008).

El contenido de fibra del aguaymanto, quito quito, promedio de frutos y de la dieta resultaron mayores

quito quito presented high content of phosphorus, magnesium, copper and iron with respect to the IDR10 of vulnerable groups, providing the necessary requirements.

Bioactive compounds and antioxidant capacity

The content of the bioactive components of the fruits aguaymanto, quito quito, average of the fruits and

al IDR10 para cada grupo vulnerable estudiado. Al respecto, Mesquita de Carvalho *et al.* (2019), Larrauri *et al.* (1996); Wang y Jiao (2000) Staffolo *et al.* (2004) y Ajila *et al.* (2008) señalan que la fibra dietética favorece un mejor control de la glicemia, diabetes, colesterol alto, cáncer de colon y desórdenes gastrointestinales y del colesterol.

El alto contenido de cobre y de hierro encontrados en los frutos estudiados, cubren las necesidades nutricionales requeridas diarias solo con el consumo de 100 gramos de los frutos y de la dieta establecida. Los frutos de aguaymanto, pitahaya y quito quito presentaron alto contenido de fósforo, magnesio, cobre y hierro respecto al IDR10 de grupos vulnerables, aportando los requerimientos necesarios.

Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante

El contenido de los componentes bioactivos de los frutos aguaymanto, quito quito, promedio de los frutos y promedio de la dieta resultaron significativamente mayores al IDR10, requeridos para los grupos vulnerables estudiados (Cuadro 3).

Con relación al contenido de vitamina C, los valores promedios encontrados variaron de 55,5 a 62,61 mg.día⁻¹, que representa del 50 al 80 % del requerimiento diario requerido para grupos vulnerables. De acuerdo con la Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (2000) los requerimientos diarios de vitamina C para los grupos vulnerables estudiados oscilan entre 75 y 120 mg.día⁻¹.

average of the diet were significantly higher than the IDR10, required for the vulnerable groups studied (Table 3).

Regarding the content of vitamin C, the average values found ranged from 55.5 to 62.61 mg.day⁻¹, which represents 50 to 80% of the daily requirement required for vulnerable groups. According to the Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (2000), the daily requirements of vitamin C for the vulnerable groups studied range between 75 and 120 mg.day⁻¹.

In bioactive compounds, the values found for total carotenoids and polyphenols stand out. The majority contribution of carotenoids in the proposed diet is mainly due to the fruits of aguaymanto and quito quito, since the pitahaya contains a low content of carotenoids due to the whitish to transparent color of the pulp, in contrast to the aguaymanto and the quito quito which are orange yellow in color, characteristic of carotenoids.

In this regard, Puente *et al.* (2011), point out that the main active components of vitamin A in fruits are α -carotene, β -carotene and β cryptoxanthin; the most common carotenoids are β -carotenes, because none of the other carotenoids are present in provitamin A, which has half the activity of β -carotene; it is also less extensive in nature.

On the other hand, Gancel *et al.* (2008) indicate that *Solanum quitoense* has all-trans- β -carotene as the main carotenoid, followed by 13-cis- β -carotene and lutein and has

Cuadro 3. Aporte promedio de los componentes bioactivos de los frutos nativos respecto al IDR10 en el adulto mayor, madres gestantes y madres en período de lactancia.

Table 3. Average contribution of the bioactive components of native fruits with respect to the IDR10 in the elderly, pregnant mothers and lactating mothers.

	Carotenoides* (mg.día ⁻¹)	Polifenoles Totales* (mg.día ⁻¹)	Vitamina C* (mg.día ⁻¹)
IDR 10 Adulto Mayor	0,090 ^a	117,10 ^a	9,0 ^a
IDR 10 Madres gestantes	0,075 ^b	117,10 ^a	8,5 ^b
IDR 10 Madres en lactancia	0,130 ^c	117,10 ^a	8,5 ^c
Aguaymanto	1,600 ^g	125,865 ^d	86,280 ^f
Pitahaya	0,097 ^a	76,030 ^e	19,920 ^g
Quito Quito	1,488 ^f	134,476 ^f	60,288 ^b
Promedio frutos	1,062 ^d	112,12 ^b	55,50 ^d
Promedio Dieta	1,255 ^e	119,34 ^c	62,61 ^e

*Valor medio de cinco mediciones (n=5); medias dentro de una columna con diferentes letras son significativamente diferentes a $p \leq 0.05$

*Mean value of five measurements (n = 5); means within a column with different letters are significantly different at $p \leq 0.05$

En los compuestos bioactivos destacan los valores encontrados para los carotenoides y polifenoles totales. El aporte mayoritario de los carotenoides en la dieta propuesta se debe principalmente a los frutos de aguaymanto y quito quito, ya que la pitahaya contiene un bajo contenido de carotenoides por el color blanquecino a transparente de la pulpa, en contraste del aguaymanto y del quito quito que son de color amarillo anaranjado, característicos de los carotenoides.

Al respecto Puente *et al.* (2011), señalan que los principales componentes activos de la vitamina A en las frutas son el α -caroteno, β -caroteno y β criptoxantina; los carotenoides más comunes son los β -carotenos, porque ninguno de los

chlorogenic acids, dihydrocafeoyl spermidine and flavonol glycosides as its main phenolic compounds; likewise, they mention that the aguaymanto fruit presents the highest contribution of phenolic compounds per day in relation to the IDR10.

With respect to phenols, Medina-Medrano *et al.* (2015) studied the composition of phenolic compounds of the genus *Phisalys* sp., finding that the leaves and calyces have as main phenolic compound the 3-O-glucoside derived from kaempferol and in the fruits phenolic acids predominate, both compounds with high antioxidant activity.

The fruits studied on average and in the proposed diet presented high values of antioxidant capacity (Table 4).

otros carotenoides está presente en la provitamina A, que tiene la mitad de la actividad del β -caroteno; también es menos extenso en la naturaleza.

Por otra parte, Gancel *et al.* (2008) indican que el *Solanum quitoense* presenta como principal carotenoide al all-trans- β -caroteno, seguido de 13-cis- β -caroteno y de la luteína y posee como principales compuestos fenólicos a los ácidos clorogénicos, dihidrocafeoil espermidina y flavonol glicosidos; asimismo, mencionan que el fruto de aguaymanto presenta el mayor aporte de compuestos fenólicos por día con relación al IDR10.

Con respecto a los fenoles, Medina-Medrano *et al.* (2015) estudiaron la composición de los compuestos fenólicos del género *Phisalys* sp., encontrando que las hojas y los cálices tienen como compuesto fenólico principal el 3-O-glucósido derivado del kaempferol y en los frutos predominan los ácidos fenólicos, ambos compuestos con elevada actividad antioxidante.

Los frutos estudiados en promedio y en la dieta propuesta presentaron valores altos de capacidad antioxidante (Cuadro 4).

Con relación a la capacidad antioxidante, se encontró en todos los tratamientos evaluados niveles superiores al IDR10 reportadas por Saura-Calixto y Goñi (2006) para la dieta mediterránea española cuya capacidad antioxidante total reportada es de 3549 μ mol de equivalentes de trolox, derivadas del consumo de bebidas, frutas y vegetales, donde recomienda un consumo diario del 10 % de la capacidad antioxidante total de la dieta estudiada.

Regarding the antioxidant capacity, levels higher than the IDR10 reported by Saura-Calixto and Goñi (2006) for the Spanish Mediterranean diet were found in all the evaluated treatments, whose total antioxidant capacity reported is 3549 μ mol of trolox equivalents, derived from consumption of drinks, fruits and vegetables, where it recommends a daily consumption of 10 % of the total antioxidant capacity of the studied diet.

Dietary reference intake (IDR)

The fruits of aguaymanto and quito quito reported the highest values of general indices, close to value four (4) with respect to the general indices of the vulnerable groups studied (Table 5).

The general index determined from the desirability function was more than triple the IDR10 value, the comparison test being significant ($p \leq 0.05$) between all treatments, so it can be inferred that the average daily consumption of the fruits aguaymanto, pitahaya and quito quito independently or alternately daily, represent a potential source of nutrients, bioactive compounds and antioxidant capacity in the nutritional requirements of vulnerable groups.

Conclusions

The native Peruvian fruits: aguaymanto, pitahaya and Quito Quito have a high content of nutritional, bioactive compounds and antioxidant capacity, which can satisfy a large part of the daily nutritional requirements, necessary for vulnerable populations such as the elderly, pregnant mothers and

Cuadro 4. Aporte promedio de la capacidad antioxidante de los frutos nativos respecto al IDR10 en el adulto mayor, madres gestantes y madres en período de lactancia.

Table 4. Average contribution of the antioxidant capacity of native fruits with respect to the IDR10 in the elderly, pregnant mothers and lactating mothers.

	Capacidad antioxidante* ($\mu\text{moles trolox.día}^{-1}$)
IDR 10 Adulto Mayor	354,90 ^a
IDR 10 Madres gestantes	354,90 ^a
IDR 10 Madres en lactancia	354,90 ^a
Aguaymanto	1974,79 ^d
Pitahaya	1275,60 ^e
Quito Quito	1775,86 ^f
Promedio frutos	1675,42 ^b
Promedio Dieta	1755,38 ^c

*Valor medio de cinco mediciones (n=5); medias dentro de una columna con diferentes letras son significativamente diferentes a $p \leq 0,05$.

*Mean value of five measurements (n = 5); means within a column with different letters are significantly different at $p \leq 0.05$.

Ingesta dietética de referencia (IDR)

Los frutos de aguaymanto y quito quito reportaron los mayores valores de índices generales, cercanos al valor cuatro (4) respecto de los índices generales de los grupos vulnerables estudiados (Cuadro 5).

El índice general determinado a partir de la función de deseabilidad resultó más del triple del valor de IDR10, resultando significativa ($p \leq 0,05$) la prueba de comparación entre todos los tratamientos, por lo que se puede inferir que el consumo promedio diario de los frutos aguaymanto, pitahaya y quito quito de manera independiente o de forma alternada diariamente, representan una fuente potencial de nutrientes, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en el requerimiento nutricional de grupos vulnerables.

mothers in lactation period whose consumption could bring health benefits in this type of populations considered high risk, who require a balanced diet to meet their needs in terms of micronutrients, fiber, vitamin C, carotenoids, polyphenols and antioxidant capacity.

Acknowledgments

The authors thank the National Fund for Scientific and Technological Development (FONDECYT) of Lima, Peru, for the support provided and the Graduate School of the National University Federico Villarreal for the facilities provided for the completion of this study.

End of English Version

Cuadro 5. Índice general de los componentes nutricionales, bioactivos y capacidad antioxidante en adulto mayor, madres gestantes y madres en período de lactancia.

Table 5. General index of nutritional and bioactive components and antioxidant capacity in older adults, pregnant mothers and lactating mothers.

	Adulto Mayor*	Madres Gestantes*	Madres en lactancia*
IDR10	1,0 ^a	1,0 ^a	1,0 ^a
Aguaymanto	4,0 ^b	3,8 ^b	3,7 ^b
Pitahaya	2,0 ^e	1,9 ^c	1,8 ^c
Quito Quito	3,9 ^b	3,7 ^b	3,5 ^d
Promedio frutos	3,5 ^c	3,3 ^d	3,2 ^e
Promedio dieta	3,7 ^d	3,5 ^e	3,4 ^d

*Valor medio de cinco mediciones (n=5); medias dentro de una misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes a $p \leq 0.05$.

*Mean value of five measurements (n = 5); means within the same column with different letters are significantly different at $p \leq 0.05$.

Conclusiones

Las frutas nativas peruanas: aguaymanto, pitahaya y quito quito presentan un alto contenido de compuestos nutricionales, bioactivos y capacidad antioxidante, que pueden satisfacer una gran parte de los requerimientos nutricionales diarios, necesarios para poblaciones vulnerables como los adultos mayores, madres gestantes y madres en período de lactancia cuyo consumo pudiera traer beneficios para la salud en este tipo de poblaciones consideradas de alto riesgo, que requieren de una dieta equilibrada para satisfacer sus necesidades en cuanto a micronutrientes, fibra, vitamina C, carotenoides, polifenoles y capacidad antioxidante.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT) de Lima, Perú, por el apoyo brindado y a la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional Federico Villarreal por las facilidades brindadas para la culminación del presente estudio.

Literatura citada

- AOAC. 2012. Official Methods of Analysis of AOAC International, 19th ed., Gaithersburg, Maryland, U.S.A.
- Ajila, C. M., K. Leelavathi and U. Rao. 2008. Improvement of dietary fiber content and antioxidant properties in soft dough biscuits with the incorporation of mango peel powder. *J. Cereal Sci.* 48(2): 319-326.

- Benassi, M. D. T. and J. Antunes. 1988. A comparison of metaphosphoric and oxalic acids as extractants solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. *Arq. Biol. Tecnol.* 31(4): 507-513.
- Blanco de Alvarado, T. 2016. Alimentos nativos del Perú al mundo. Lima, Perú: Ed. USIL.
- Bravo, K., F. Alzate y E. Osorio. 2016. Fruits of selected wild and cultivated Andean plants as sources of potential compounds with antioxidant and anti-aging activity. *Ind. Crop. Prod.* 85: 341-352.
- Campos, D., R. Chirinos, G. Ranilla and R. Pedreschi. 2018. Bioactive potential of andean fruits, seeds, and tubers. p. 287-343. *In* Toldra F. (Ed.) *Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Cereceda, M. 2008. *Dietética de la teoría a la práctica*. 1ª ed., Lima: Fondo Editorial UNMSM.
- Continente, A. C. y D. Bellido. 2006. Bases científicas de una alimentación saludable. *Rev. Med.* 50(4): 7-14.
- Costa, A. G. V., F. Garcia-Diaz, P. Jimenez and I. Silva. 2013. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. *J. Funct. Food.* 5(2): 539-549.
- Curi-Quinto, K., E. Ortiz-Panozo and L. De Romaña. 2019. Malnutrition in all its forms and socio-economic disparities in children under 5 years of age and women of reproductive age in Peru. *Public Health Nutr.* 1-12.
- Dos Santos, M. D., S. Mamede, M. Rufino, S. De Brito, and R. Alves. 2015. Amazonian native palm fruits as sources of antioxidant bioactive compounds. *Antioxidants.* 4(3): 591-602.
- Food and Nutrition Board (FNB), Institute of Medicine (IOM). 2000. *Dietary Reference Intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids*. National Academy Press, Washington, D.C.
- Gancel, A., P. Alter, C. Dhuique, J. Ruales and F. Vaillant. 2008. Identifying carotenoids and phenolic compounds in naranjilla (*Solanum quitoense* Lam. var. Puyo hybrid), an Andean fruit. *J. Agric. Food Chem.* 56(24): 11890-11899.
- Gutiérrez, P. y R. De la Vara. 2008. *Análisis y diseño de experimentos*. 2da edición. México D.F: McGraw-Hill.
- Karasawa, M. M. and C. Mohan. 2018. Fruits as prospective reserves of bioactive compounds: a review. *Nat. Products Bioprospect.* 8(5): 335-346.
- Larrauri, J., P. Rupérez, L. Bravo and F. Saura-Calixto. 1996. High dietary fibre powders from orange and lime peels: associated polyphenols and antioxidant capacity. *Food Res. Int.* 29(8): 757-762.
- Martínez, N., M. Vidal y J. Lahuerta. 2008. Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad dietética.* 12(2): 64-68.
- Medina-Medrano, J. R., N. Almaraz-Abarca, S. González-Elizondo, N. Uribe-Soto, S. González-Valdez and Y. Herrera-Arrieta. 2015. Phenolic constituents and antioxidant properties of five wild species of *Physalis* (Solanaceae). *Bot. Stud.* 56(1): 24.
- Mesquita de Carvalho, C., L. Azevedo Gross, M. Jobim de Azevedo and L. Verçoza Viana, 2019. Dietary fiber intake (supplemental or dietary pattern rich in fiber) and diabetic kidney disease: A systematic review of clinical trials. *Nutrients.* 11(2): 347.
- Mostacero-León, J., F. Mejía-Coico, D. Gastañadui-Rosas y J. De La Cruz-Castillo. 2017. Inventario taxonómico, fitogeográfico y etnobotánico de frutales nativos del norte del Perú. *Sci. Agropecu.* 8(3): 215-224.
- Nugent, R., C. Levin, J. Hale and B. Hutchinson, B. 2020. Economic effects of the double burden of malnutrition. *The Lancet.* 395(10218): 156-164.




- Pedrosa, I., J. Juarros, A. Robles, J. Basteiro and E. García, E. 2015. Goodness of Fit Tests for Symmetric Distributions, which Statistical Should I Use?. *Univ. Psychol.* 14(1): 245-254.
- Pennington, J. A. T. and A. Fisher. 2010. Food component profiles for fruit and vegetable subgroups. *J. Food Compos. Anal.* 23(5): 411-418.
- Puente, L., C. Pinto, E. Castro and M. Cortés. 2011. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Res. Int.* 44(7): 1733-1740.
- Romero, M., F. Noriega, M. Fariás, M. Belchi, P. Jara y B. Vera. 2019. Nuevas fuentes de antioxidantes naturales: caracterización de compuestos bioactivos en cinco frutos nativos de Chile. *Revista Perfiles.* 22(2): 34-41.
- Saura, F. and I. Goñi. 2006. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chem.* 94(3): 442-447.
- Shashirekha, M. N., E. Mallikarjuna and S. Rajarathnam. 2015. Status of bioactive compounds in foods, with focus on fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55(10): 1324-1339.
- Septembre-Malaterre, A., F. Remize and P. Pouchet. 2018. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Res. Int.* 104: 86-99.
- Singleton, V. and J. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 16(3): 144-158.
- Staffolo, M. D., N. Bertola and M. Martino. 2004. Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt. *Int. Dairy J.* 14(3): 263-268.
- Talcott, T. and R. Howard. 1999. Phenolic autoxidation is responsible for color degradation in processed carrot puree. *J. Agric. Food Chem.* 47(5): 2109-2115.
- Wang, S. Y. and H. Jiao. 2000. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *J. Agric. Food Chem.* 48(11): 5677-5684.
- Wu, F. C. 2004. Optimization of correlated multiple quality characteristics using desirability function. *Quality engineering.* 17(1): 119-126.

Valoración y disposición a pagar por los consumidores de elote en México

Valuation and willingness to pay for corn on the cob consumers in Mexico

Avaliação e vontade de pagar pelos consumidores de milho no México

Carla Zulema Jauregui García; Anastacio Espejel García* y Arturo Hernández Montes

Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), K.m. 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, México. C.P. 56230. Correo electrónico: (CZ) carlazulema08@gmail.com, ; (AE) anastacio.espejel@gmail.com, ; (AH) sensorial@prodigy.net.mx. 

Resumen

El elote es un alimento tradicional en México que ha sido influenciado por la dinámica actual de los mercados, ocasionando la sustitución de las variedades criollas por variedades mejoradas e híbridos. Los alimentos son caracterizados por un conjunto de atributos que pueden estar asociados a una evaluación subjetiva, a partir de la cual es posible aproximar una función de utilidad y determinar elementos para su valoración. El objetivo del presente trabajo fue determinar los atributos que inciden en la valoración del elote por los consumidores y la disposición a pagar un sobreprecio por diferentes tipos de elote. La metodología se basó en un estudio de valoración contingente, con un total de 356 consumidores seleccionados por un muestreo no probabilístico (confiabilidad 95% y error del 7%) quienes respondieron un cuestionario diseñado en Google forms, abordando información sociodemográfica del consumidor, atributos del elote y la disposición a pagar (DAP). La DAP un extra por los elotes estuvo influenciada significativamente cuando el consumidor determinó que es importante conocer si el elote proviene de semilla criolla o modificada y si este cuenta con alguna certificación. Los elotes criollos y de importación obtuvieron mayor disposición a pagar, otorgando mayor valoración a estos productos. En conclusión, el presente trabajo explora la valoración económica de elotes, donde los factores significativos pueden ser

Recibido el 27-07-2020 • Aceptado el 30-10-2020.

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: anastacio.espejel@gmail.com

empleados para inducir un efecto en los consumidores, particularmente, en la revaloración de los elotes criollos.

Palabras clave: disposición a pagar, elote, preferencias del consumidor, valorización.

Abstract

The corn is a traditional food in Mexico that has been influenced by the current dynamics of the markets, causing the replacement of creole varieties by improved varieties and hybrids. Foods are characterized by a set of attributes that can be associated with a subjective evaluation, from which it is possible to approximate a utility function and determine elements for its evaluation. The objective of this work was to evaluate the Mexican consumer's willingness to pay for various types of corn and to determine which of them have a higher valuation. The methodology was based on a contingent valuation study, with a total of 356 consumers selected by snowball sampling (95% reliability and 7% error) and answering a questionnaire designed in Google forms, addressing consumer sociodemographic information, characteristics corn and their willingness to pay (WP). The WP extra for corn was significantly influenced when the consumer determined that it is important to know if the corn comes from Creole or modified seed and if it has any certification. Creole and imported corn obtained a greater willingness to pay, giving higher valuation to these products. In conclusion, the present work explores the economic valuation of corn, where significant factors can be used to induce an effect on consumers, particularly in the revaluation of creole corn.

Key words: willingness to pay, corn on the cob, consumer preferences, valorization.

Resumo

O milho é um alimento tradicional no México que tem sido influenciado pela atual dinâmica dos mercados, ocasionando a substituição de variedades crioulas por variedades melhoradas e híbridos. Os alimentos são caracterizados por um conjunto de atributos que podem ser associados a uma avaliação subjetiva, a partir dos quais é possível aproximar uma função de utilidade e determinar elementos para sua avaliação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a disposição do consumidor mexicano em pagar por diversos tipos de milho e determinar qual deles tem maior valorização. A metodologia foi baseada em um estudo de avaliação contingente, com um total de 356 consumidores selecionados por amostragem bola de neve (95% de confiabilidade e 7% de erro) e respondendo a um questionário elaborado em formulários Google, abordando informações sociodemográficas do consumidor, características milho e sua disposição a pagar (DAP). A DAP a mais pelo milho foi significativamente influenciada quando o consumidor determinou que é importante saber se o milho vem de semente crioula ou modificada e se possui

alguma certificação. O milho crioulo e o importado obtiveram maior disposição a pagar, valorizando mais esses produtos. Em conclusão, o presente trabalho explora a valoração econômica do milho, onde fatores significativos podem ser utilizados para induzir um efeito nos consumidores, particularmente na valorização do milho nativo.

Palavras-chave: disposição a pagar, milho, preferências do consumidor, apreciação.

Introducción

El maíz (*Zea mays* L.) es un alimento de gran importancia cultural, económica y social en México, supera a la de cualquier otro cultivo, al poseer cualidades alimenticias para la producción de proteína animal, consumo humano y uso industrial que lo convierte en uno de los productos más importantes (Fernández *et al.*, 2014; FIRA, 2016); además, es un producto endémico que forma parte de la alimentación nutricional básica en México (Romero-Padilla *et al.*, 2014). Una de las formas de consumo del maíz más tradicional y popular en México después de la tortilla y sus variantes, es en elote (estado inmaduro de la mazorca), el cual representa alta importancia en el consumo y la producción de maíz, específicamente, en regiones donde se cultiva para este propósito y se emplean variedades locales y nativas (Ortiz-Torres *et al.*, 2013).

Los cambios en las formas de producción y en los mercados de granos y semillas ha ocasionado el desplazamiento de variedades criollas de maíz para la producción de elotes en México, lo que ha llevado a la necesidad de identificar y promover atributos tangibles e intangibles que permitan mejorar la

Introduction

Corn (*Zea mays* L.) is a food of great cultural, economic and social importance in Mexico, surpasses that of any other crop, as it has nutritional qualities for the production of animal protein, human consumption and industrial use that makes it one of the most important products (Fernández *et al.*, 2014; FIRA, 2016); Furthermore, it is an endemic product that is part of the basic nutritional diet in Mexico (Romero-Padilla *et al.*, 2014). One of the most traditional and popular forms of corn consumption in Mexico after the tortilla and its variants, is the “elote” or the corn cob (immature state of the cob), which is important for the production market of corn, especially in the regions where it is grown for this purpose, using local and native varieties (Ortiz-Torres *et al.*, 2013).

The changes in the production process and in the grain and seed markets have caused the displacement of native varieties of corncob in Mexico, inducing the need to identify and promote tangible and intangible attributes that allow improving the value of this food by the consumer. The appreciation of traditional foods starts from a detailed understanding of how consumers perceive products,

valorización de este alimento por el consumidor. La valorización de los alimentos tradicionales parte de una profunda comprensión de cómo los consumidores perciben los productos, cómo influyen sus necesidades y cómo toman decisiones basadas en esas necesidades, así como la disposición a pagar por un producto con características típicas y únicas diferenciadoras (Van Kleef *et al.*, 2005).

El estudio de la valoración económica de un producto es una herramienta que permite conocer la disposición a pagar (DAP) del consumidor por cambios o conservación de ciertos atributos de los alimentos en donde existe un juicio de valoración (Rousseau y Vranken, 2013). La teoría económica sugiere que la disposición a pagar de un consumidor está influenciada por sus gustos y preferencias individuales, sus ingresos, actitudes y percepciones de los diferentes tipos de productos, así como las características demográficas y del hogar (Lanfranchi *et al.*, 2019).

La estimación de la DAP se ha aplicado en el sector agroalimentario, destacando las contribuciones al análisis de la conducta de compra de los individuos en los establecimientos de alimentación y los factores explicativos del consumo (Cerdan *et al.*, 2011). El enfoque de la DAP es fundamental, pues representa una fuente de conocimiento significativa sobre el cual basar las estrategias futuras de mercado (Pomarici *et al.*, 2017), y representa un aspecto relevante al describir la calidad del producto estudiado desde la

how their needs influence and how they make decisions based on those needs, as well as the willingness to pay for a product with typical and unique characteristics (Van Kleef *et al.*, 2005).

The study of the economic valuation of a product is a tool that allows knowing the consumer's willingness to pay (DAP) for changes or conservation of certain attributes in food, when making a valuation judgment (Rousseau and Vranken, 2013). Economic theory suggests that a consumer's willingness to pay is influenced by their individual tastes and preferences, their income, attitudes and perceptions of different types of products, as well as demographic and household characteristics (Lanfranchi *et al.*, 2019).

The estimation of the DAP has been applied in the agri-food sector, highlighting the contributions to the analysis of the purchasing behavior of individuals in food establishments and the explanatory factors of consumption (Cerdan *et al.*, 2011). The DAP approach is fundamental, because it represents a significant source of knowledge on which to base future market strategies (Pomarici *et al.*, 2017), and represents a relevant aspect when describing the quality of the product studied from the consumer's perception (Boncinelli *et al.*, 2019; Dal Bianco *et al.*, 2018).

In recent years, studies of the factors that influence the choice of a product and consumer purchase decisions, as well as their willingness to pay (Xie *et al.*, 2016), have

percepción del consumidor (Boncinelli *et al.*, 2019; Dal Bianco *et al.*, 2018).

Los estudios de los factores que influyen en la elección y decisiones de compra del consumidor y su disposición a pagar se han incrementado en los últimos años (Xie *et al.*, 2016), particularmente, en alimentos genéticamente modificados (Thorne *et al.*, 2017), alimentos orgánicos (Rousseau y Vranken, 2013) y alimentos funcionales (Annur *et al.*, 2020; Bentivoglio *et al.*, 2020). Diversos estudios han analizado la disposición a pagar del consumidor por productos frescos (He *et al.*, 2020; Yin *et al.*, 2019), alimentos de comercio justo (Konuk, 2019) y alimentos genéticamente modificados (Delmond *et al.*, 2018). Sin embargo, en productos tradicionales mexicanos como el maíz, las investigaciones respecto al consumidor y preferencias son escasas.

Asimismo, los estudios sobre la disposición a pagar por productos tradicionales mexicanos son escasos, los cuales podrían contribuir a la revalorización y segmentación del mercado para este grupo de alimentos emblemáticos vinculados al origen geográfico; por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar los atributos que inciden en la valoración del elote por los consumidores y la disposición a pagar un sobreprecio por diferentes tipos de elote.

Materiales y métodos

Población de estudio

Este estudio se basa en un experimento que involucra a 356

increased, particularly in the case of food genetically modified (Thorne *et al.*, 2017), organic foods (Rousseau and Vranken, 2013) and functional foods (Annur *et al.*, 2020; Bentivoglio *et al.*, 2020). Various studies have analyzed the consumer's willingness to pay for fresh products (He *et al.*, 2020; Yin *et al.*, 2019), fair trade foods (Konuk, 2019) and genetically modified foods (Delmond *et al.*, 2018). However, in traditional Mexican products such as corncob, research on consumer preferences is scarce.

Likewise, studies on the willingness to pay for traditional Mexican products are scarce, which could contribute to the revaluation and segmentation of the market for this group of emblematic foods linked to geographical origin; therefore, the objective of this research was to determine the attributes that influence the valuation of the "elote" or corncob by consumers and their willingness to pay an additional price for the different types of corncobs.

Materials and methods

Population studied

This study was conducted on a sample of 356 consumers of corncob, Mexicans over 18 years. The maximum variance was used, at a confidence level of 95% and a margin of error of 7% (Martínez and Martínez, 2008). The participants were given a survey, designed with the Google Forms application. The data was collected between September and December 2018. Consumers were recruited by various social networks;

consumidores mexicanos de elote mayores de 18 años, utilizando la máxima varianza, con una confiabilidad de 95 % y un margen de error de 7 % (Martínez y Martínez, 2008). A los participantes se les realizó una encuesta apoyándose de la aplicación Formularios de Google. Los datos fueron recopilados entre septiembre y diciembre del año 2018. Los consumidores fueron reclutados por diversas redes sociales, se adoptó el reclutamiento de muestreo de bola de nieve, con la finalidad de que fueran contactados diversos participantes y estos mismos dieran lugar a nuevos contactos, hasta que fue completado el muestreo.

Técnica de recolección de datos

El instrumento de recolección de información fue el cuestionario, cuya técnica empleada fue la encuesta. La encuesta aplicada a los consumidores de elote estuvo conformada por cinco apartados (cuadro 1); en el primer apartado, se les solicitó que proporcionaran sus datos sociodemográficos (edad, género, escolaridad, ocupación, ingreso mensual y lugar de residencia); en el segundo apartado, se presentaron cinco aseveraciones respecto a la decisión de compra del elote: a) Es importante que el elote cuente con premios o certificaciones (Premios/Certificaciones), b) Un elote certificado me brinda mayor seguridad (Seguridad), c) Para tomar una decisión de compra del elote, me baso en el conocimiento adquirido sobre el elote y mis experiencias relacionadas con él (Conocimiento), 4) Mi decisión de compra de elote se basa principalmente en la accesibilidad (Accesibilidad), y 5) Es importante conocer si el elote

the *recruitment of snowball sampling* was adopted, with the purpose that various participants were contacted, which in turn, brought new contacts, until the sample was completed.

Data collection technique

The information collection instrument was the survey type questionnaire. The survey applied to corn cob consumers was made up of five sections (table 1); in the first section, they were asked to provide their socio-demographic data (age, gender, education, occupation, monthly income and place of residence); in the second section, five statements were presented regarding the decision to buy corn cob: a) It is important that the corn cob has awards or certifications (Awards / Certifications), b) A certified corn cob gives me greater security (Security), c) To make a decision to buy corn cob, I base myself on the knowledge acquired about corn cob and my experiences related to it (Knowledge), 4) My decision to buy corn cob is based mainly on accessibility (Accessibility), and 5) It is important to know if the corn cob comes from creole or modified seeds (Seed). Consumers were instructed to rate their agreement or disagreement with each statement, using a seven-point scale (1 = strongly disagree; 7 = strongly agree).

In the third section, consumers were asked to indicate the importance for them of the quality of the corn, the price, the place of production (local or regional) or that the corn was produced by small farmers. Consumers used a seven-point scale, where 1 = not very important and 7 = very important. In

proviene de semilla criolla o modificada (Semilla); y se les indicó evaluarán que tan de acuerdo estaban con cada aseveración, empleando una escala de siete puntos (1 = totalmente en desacuerdo; 7 = totalmente de acuerdo).

En el tercer apartado, se solicitó a los consumidores indicaran que tan importante es la calidad del elote, el precio, que sea producido local o regionalmente, y por pequeños productores; empleando una escala de siete puntos, donde 1 = poco importante y 7 = muy importante. En el cuarto apartado, se les mencionó tres atributos del elote (sabor, aroma y color) y se les pidió que indicaran cómo consideran a los elotes producidos en México respecto a esos atributos, en una escala de cinco puntos, donde 1 = malo y 5 = bueno. Finalmente, en el quinto apartado, se preguntó a los consumidores la disposición a pagar extra (0, 5, 10, 20 o 30 %) por un elote rojo, blanco, amarillo, orgánico, criollo y de procedencia extranjera.

the fourth section, consumers were asked to indicate how they considered the corncob produced in Mexico with respect to flavor, aroma and color; in this case, they used a five-point scale, where 1 = bad and 5 = good. Finally, in the fifth section, consumers were asked their willingness to pay an additional price (0, 5, 10, 20 or 30%) for a red, white, yellow, organic, creole corncob and of foreign origin.

Analysis of the information

For the evaluation of willingness to pay (dichotomous dependent variable: purple corncob, white corncob, yellow corncob, organic corncob, creole corncob and corncob of foreign origin), a logistic regression was applied, using as independent variable: a) sociodemographic characteristics; b) ratings of the five statements (certifications, security, knowledge, accessibility and seed); c) ratings of the importance of the characteristics of quality, price, place of production and production by small producers;

Cuadro 1. Dimensiones de las variables evaluadas.

Table 1. Dimensions of the evaluated variables.

Variable	Apartado	Dimensión	
Independiente	1	Sociodemográfica	
	2	Decisión de compra	
	3	Atributos del elote mexicano	
	4	Características del elote	
Dependiente	6	Disposición a pagar	
			Elote rojo
			Elote blanco
			Elote amarillo
			Elote orgánico
Elote criollo			
		Elote de importación	

Análisis de la información

Para cada disposición a pagar evaluada (variable dependiente dicotómica: elote morado, elote blanco, elote amarillo, elote orgánico, elote criollo y elote de procedencia extranjera), se aplicó una regresión logística, utilizando como variable independiente: a) características sociodemográficas; b) calificaciones de las cinco aseveraciones evaluadas (certificaciones, seguridad, conocimiento, accesibilidad y semilla); c) calificaciones de la importancia de las características de calidad, precio, producido localmente y producido por pequeños productores; y d) las calificaciones de los atributos del elote producido en México (sabor, aroma y color). Los datos obtenidos fueron procesados utilizando un modelo Logit, estimado por máxima verosimilitud (Loureiro y Hine, 2002), empleado el programa XLSTAT versión 2014 (Addinsoft, U.S.A.).

Finalmente, se calculó el promedio de personas que estuvieron dispuestas a pagar cada porcentaje extra (0, 5, 10, 20 y 30 %) para cada tipo de elote; y se realizó una prueba de K-proporciones con la finalidad de conocer si existe diferencia de los elotes evaluados en cada porcentaje de disposición a pagar. Para el análisis de los datos se empleó el programa XLSTAT Versión 2014.5.03. (Addinsoft, USA).

Resultados y discusión

Características sociodemográficas de los participantes

Las características sociodemográficas de los encuestados se presentan en el

and d) the qualifications of the attributes of the corncob produced in Mexico (flavor, aroma and color). The data obtained were processed using a Logit model, estimated by maximum likelihood function (Loureiro and Hine, 2002). The XLSTAT version 2014 program (Addinsoft, U.S.A.) was used.

Finally, the average of people who were willing to pay an additional value (0, 5, 10, 20 and 30%) for each type of corncob was calculated. A K-proportions test was carried out in order to know if there was a difference between the evaluated corncob for each additional percentage that the consumer was willing to pay. For the data analysis, the XLSTAT Version 2014.5.03 program was used (Addinsoft, USA).

Results and discussion

Socio-demographic characteristics of the participants

The sociodemographic characteristics of the respondents are presented in table 2. A 65% participation of female respondents was obtained; the majority students (48%) and with postgraduate studies. More than 60% had income greater than \$ 10,000.00 MX.

Purchase attributes and consumer willingness to pay

The results of the econometric models presented the significant variables that influence the dispositions to pay. Table 3 shows the significance of the logistic regressions; it was observed that the sociodemographic characteristics

cuadro 2., se obtuvo una participación de 65 % del género femenino, la escolaridad con mayor porcentaje fue estudios de posgrado, la ocupación con mayor porcentaje fue estudiantes (48 %) y más del 60 % contaba con ingresos mayores a \$10,000.00 MX.

and attributes of the corncob were not significant for the consumer's willingness to pay.

The fact that the willingness to pay an extra price for corn is not influenced by sociodemographic characteristics could be due to the fact that corn is

Cuadro 2. Características sociodemográficas de los participantes (%).

Table 2. Socio-demographic characteristics of the participants (%).

Variable	Categorías	Porcentaje
Género	Femenino	65,8
	Masculino	34,2
Escolaridad	Sin escolaridad	0,0
	Básica	0,4
	Media superior	1,0
	Superior	33,1
Ocupación	Posgrado	65,5
	Estudiante	48,1
	Trabaja por su cuenta	14,5
	Labores del hogar	3,6
	Empleado de gobierno	12,8
	Empleado (no de gobierno)	21,0
Ingreso mensual	\$ 1 - \$ 1,500	9,4
	\$ 1,501 - \$ 5,000	8,7
	\$ 5,001 - \$ 10,000	20,9
	> \$ 10,000	61,1

Atributos de compra y disposición a pagar del consumidor

Los resultados de los modelos econométricos presentaron las variables significativas que influyen en las disposiciones a pagar. En el cuadro 3, se muestra la significancia de las regresiones logísticas; se observó que las características

a product of general consumption and the price is accessible to Mexican consumers. In addition, corn is a product that is consumed for pleasure and not for nutritional conditions, therefore, for the Mexican population its consumption is indifferent, so they are not willing to pay an additional price. This is contrary to what was

sociodemográficas y atributos del elote no fueron significativas para la mayor disposición a pagar.

El hecho de que la disposición a pagar un precio extra por elote no esté influenciada por las características sociodemográficas, se pudo deber a que el elote es un producto de consumo generalizado y precio accesible para los consumidores y la población mexicana, además es un producto que se consume por gusto y no por condiciones de nutrición por lo cual, el consumirlo o no es indiferente para los consumidores mexicanos de ahí la no disposición a pagar un extra y su relación con las variables sociodemográficas; contrario a lo reportado por Wu *et al.* (2015), quienes encontraron en un estudio de carne de cerdo en China que el género, la edad, el ingreso familiar mensual y el nivel de educación influyeron significativamente en la preferencia y la disposición a pagar un sobreprecio por la carne de cerdo y lo encontrado por Lim *et al.* (2013), que concluyeron que el género, la edad, la educación y los niveles de ingresos de los consumidores afectan significativamente sus preferencias y disposición a pagar debido a que la carne es un producto que ha ganado mercado en estratos de la población de ingresos medios a altos, en contraste con el consumo de elotes en México en donde el producto es de bajo precio y no se asocia su consumo con algún estrato social de la población, incluso, debido a los canales de comercialización podría asociarse su consumo con estratos de bajos ingresos.

Los resultados de los modelos econométricos de regresiones

reportado by Wu *et al.* (2015), who found in a study of pork in China that gender, age, monthly family income and education level significantly influenced the preference and willingness to pay a premium for pork. Similarly, Lim *et al.* (2013) concluded that the gender, age, education and income levels of consumers significantly affected their preferences and willingness to pay, since meat is a product that has gained market in strata of the middle-income population to high. In contrast, corn in Mexico is a low-priced product and its consumption is not associated with any social stratum of the population; However, the consumption of corn could be associated with low-income strata, due to the marketing channels.

The econometric models obtained from the logistic regressions of the willingness to pay based on the purchase assertions were significant ($p < 0.05$) for all the types of corncob analyzed, except for the red / purple corncob. In the case of the logistic regressions of the willingness to pay versus the characteristics of the corncob produced in Mexico, the results were significant ($p < 0.05$) with the red / purple, white, creole and imported corncob. The significance ($p < 0.05$) of the logistic regressions showed a relationship of the variables with the willingness to pay an additional price, from which, the willingness of an individual to pay for the different types of corncob could be predicted (Table 3).

Of the nine econometric models developed, three of them were not significant with the variables related to the characteristics of the corn. The

logísticas de la disposición a pagar con las aseveraciones de compra resultaron significativos ($p < 0,05$) en todos los tipos de elotes analizados, excepto para los elotes rojos/morados; en el caso de las regresiones logísticas de la disposición a pagar y las características del elote producido en México resultaron significativas ($p < 0,05$) con los elotes rojos/morados, blancos, criollo y de importación. La significancia ($p < 0,05$) de las regresiones logísticas demostró una relación de las variables con la disposición extra a pagar, con las cuales se podría predecir la disposición a pagar de un individuo para los diferentes tipos de elote (cuadro 3).

variables that were significant were related to the characteristics of the imported corn and the consumer's willingness to pay for this type of corn.

Variables of the willingness to pay an additional price for the corncob

The willingness to pay for a red corncob based on the evaluations of the characteristics showed a significant econometric model (table 4), where the variable "farmer" was significant ($p = 0.000$). These results indicated that consumers who attached greater importance to corncob production by small farmers are more likely to pay an extra premium for red / purple corncob. The results of the marginal

Cuadro 3. Significancias de las regresiones logísticas de la disposición a pagar sobreprecio (%) por elote.

Table 3. Significance of the logistic regressions of the willingness to pay an additional price (%) per corn.

Tipo de elote	Variables			
	Características sociodemográficas	Decisión de compra	Atributos del elote	Características del elote
Blanco	0,056	0,046	0,069	0,044
Rajo/morado	0,248	0,052	0,148	< 0,0001
Amarillo	0,139	< 0,0001	0,965	0,075
Orgánico	0,714	0,000	0,466	0,067
Criollo	0,768	< 0,0001	0,213	0,000
De importación	0,142	0,002	0,373	0,005

Los modelos econométricos significativos fueron nueve, sin embargo, tres de estos modelos no obtuvieron variables de aseveraciones de compra o características del elote evaluadas significativamente dentro del modelo; estos modelos fueron

effect suggest that consumers would be willing to pay extra for corncob produced by small farmers and for higher quality, which is associated with colored corncob.

Table 5 presents the econometric model of the willingness to pay for a

los obtenidos de la disposición a pagar por un elote blanco respecto a las aseveraciones de compra y a las características del elote y de la disposición a pagar por un elote de importación respecto a las características del elote.

Variables de la disposición a pagar extra por elotes

La disposición a pagar por un elote rojo basado en las evaluaciones de las características arrojó un modelo econométrico significativo (cuadro 4), en donde la variable “productor” fue significativa ($p = 0,000$). Estos resultados implican que los consumidores que otorgaron mayor importancia a la producción de elotes por pequeños productores se encuentran más propensos a pagar una prima extra por elotes rojos/morados. Los resultados del efecto marginal sugieren que los consumidores estarían dispuestos a pagar un extra por atributos como producido por pequeños productores y por una mayor calidad que asocian con el maíz de color.

yellow corncob based on the purchase assertions. The security and accessibility variables were significant for this model ($p = 0.001$ and $p = 0.020$, respectively), revealing that when a consumer agreed with the fact that a certified corncob provides greater security, and that in addition, the purchase decision of corncob was based mainly on accessibility, the possibility of paying a premium for a yellow corncob was greater, according to the marginal effects.

The econometric model of the willingness to pay an extra price (%) for an organic corn based on the purchase assertions is shown in table 6. For this model, the variables security ($p = 0.008$) and seed ($p = 0.000$), presenting a positive contribution to the model. These results imply that the willingness to pay a premium for an organic corncob is greater according to the marginal effects of the model, when the consumer knows if the corn comes from creole or modified seed and when he has access to a certified corncob, which he considers as a safe food for human consumption

Cuadro 4. Modelo econométrico de la disposición a pagar extra (%) por un elote rojo/morado según características del elote.

Table 4. Econometric model of the willingness to pay an additional price (%) for a red / purple corncob according to its characteristics.

Variable	Parámetros del modelo			
	Efecto marginal	Error estándar	Pr > z	Verosimilitud
Producido localmente	-0,011	0,020	0,720	$\chi^2 = 26,24$
Producido por pequeños productores	0,067	0,019	0,000	<i>g.l.</i> = 4,350
La calidad	0,001	0,021	0,487	$p < 0,0001$
El precio	-0,010	0,017	0,720	

En el cuadro 5, se presenta el modelo econométrico de la disposición a pagar por un elote amarillo con las aseveraciones de compra. Las variables seguridad y accesibilidad resultaron significativas para este modelo ($p = 0,001$ y $p = 0,020$, respectivamente), lo cual reveló que cuando un consumidor estaba de acuerdo con el hecho de que un elote certificado brinda mayor seguridad y que la decisión de compra de elotes se basaba principalmente en la accesibilidad, la posibilidad de pagar un sobreprecio por un elote amarillo era mayor de acuerdo con los efectos marginales.

The reference of the origin of the seed (creole or modified) provides information on the traceability of the product, which can be a determining factor for the consumer’s willingness to pay an additional price for the corncob. This coincides with the works published by Liu *et al.* (2019), Lu *et al.* (2020) and Xu *et al.* (2019), who found that consumers in various countries are generally willing to pay an additional price for the traceability attribute.

Other research has also concluded that consumers are motivated to buy organic products, mainly, by

Cuadro 5. Modelo econométrico de la disposición a pagar extra (%) por un elote amarillo según aseveraciones de decisión de compra.

Table 5. Econometric model of the willingness to pay an additional price (%) for a yellow corn according to the purchase decision assertions.

Parámetros del modelo				
Variable	Efecto marginal	Error estándar	Pr > z	Verosimilitud
Premios/Certificaciones	-0,002	0,018	0,542	$\chi^2=26,84$
Seguridad	0,056	0,016	0,000	$g.l. = 5,350$
Conocimiento	-0,007	0,015	0,685	$p < 0,0001$
Accesibilidad	0,037	0,016	0,010	
Semilla	-0,003	0,012	0,607	

El modelo econométrico de la disposición a pagar extra (%) por un elote orgánico basado en las aseveraciones de compra se muestra en el cuadro 6; para este modelo resultaron significativas las variables seguridad ($p = 0,008$) y semilla ($p = 0,000$), presentando una contribución positiva en el modelo. Estos resultados implican que la

supporting local farmers (Bilal and Lal, 2019; Aschemann-Witzsel *et al.*, 2013), in addition to considering locally produced food as reliable and cool. On the other hand, Konuk (2019), reported that awareness of fair consumption, environmental concern and the confidence provided by the product label were positively correlated with the willingness

disposición a pagar un sobreprecio por un elote orgánico es mayor de acuerdo con los efectos marginales de modelo, cuando el consumidor conoce si el elote proviene de semilla criolla o modificada, y cuando considera que un elote certificado es un alimento seguro para el consumo, cuando tiene acceso y se siente seguro al consumirlo.

La referencia del origen de la semilla (criolla o modificada) proporciona información sobre la trazabilidad del producto, lo cual puede ser un factor determinante para la disposición del consumidor a otorgar un sobreprecio al elote, como lo reportado por Liu *et al.* (2019), Lu *et al.* (2020) y Xu *et al.* (2019), quienes encontraron que los consumidores de varios países generalmente están dispuestos a pagar una prima por el atributo de trazabilidad.

Otras investigaciones también han concluido que los consumidores se encuentran motivados a comprar productos orgánicos, principalmente, por el apoyo a los agricultores locales (Bilal y Lal, 2019; Aschemann-Witzel *et al.*, 2013), además de que consideraron a los alimentos producidos localmente como confiables y frescos; por otra parte, Konuk (2019), reportó que la conciencia de consumo justo, la preocupación ambiental y confianza que brinda la etiqueta del producto estuvieron correlacionados positivamente con la disposición de los consumidores a comprar y la disposición a pagar un sobreprecio en alimentos.

of consumers to buy and pay an additional price for food

The econometric model of the willingness to pay an additional price for a creole corncob with respect to the affinity with the purchase assertions is shown in table 7. The model was significant ($p < 0.0001$); the seed variable was significant ($p < 0.0001$) and the marginal effects suggest that for the creole corn consumer the certifications are not a reason to pay an additional price. This is explained by the confidence that the consumer has over the creole corncob, while for the rest of the statements shown in Table 7, the marginal effect is positive, that is, there is a greater willingness to pay an additional price.

On the other hand, when evaluating the econometric model of the willingness to pay with respect to the characteristics of the corncob (table 8), the variable "farmer" was significant ($p = 0.016$). According to these results, a consumer considered it important to know the origin of the corncob seed (creole or modified); in this way, the consumer showed a willingness to pay an additional price for the creole corncob produced by small farmers.

This result is similar to that concluded by Mennecke *et al.*, (2007), who studied the preferences of US consumers for the attributes of beef, finding that the region of origin is the most important attribute for consumers, followed by the breed, traceability to the farm and animal feed.

The greater willingness of consumers to pay for a Creole corn

Cuadro 6. Modelo econométrico de la disposición a pagar extra (%) por un elote orgánico según aseveraciones de decisión de compra.

Table 6. Econometric model of the willingness to pay an additional price (%) for an organic corncob according to the purchasing decision assertions.

Parámetros del modelo				
Variable	Efecto marginal	Error estándar	Pr > z	Verosimilitud
Premios/Certificaciones	-0.025	0,015	0,956	$\chi^2 = 24,87$
Seguridad	0,033	0,014	0,008	<i>g.l.</i> = 5,350
Conocimiento	0,014	0,012	0,114	<i>p</i> = 0,000
Accesibilidad	0,007	0,013	0,303	
Semilla	0,037	0,010	< 0,0001	

El modelo econométrico de la disposición a pagar un sobreprecio por un elote criollo respecto a la afinidad con las aseveraciones de compra se muestra en el cuadro 7. El modelo resultó significativo ($p < 0,0001$), dentro de este, la variable semilla fue significativa ($p < 0,0001$), los efectos marginales sugieren que para el consumidor de elote criollo las certificaciones no son una variable por la que pueda pagar más, lo cual se explica mediante la confianza que el consumidor posee sobre el elote criollo, mientras que por el resto de aseveraciones que se muestran en el Cuadro 7, el efecto marginal es positivo, es decir existe una mayor disposición a pagar.

Por otra parte, al evaluar el modelo econométrico de la disposición a pagar respecto a las características del elote (Cuadro 8) fue significativa la variable “productor” ($p = 0,016$). Lo cual indicó que cuando un consumidor consideró importante conocer el origen de la semilla del elote (criollo o modificado) y

was related to its good quality, low price and for being produced locally by small farmers.

The econometric model of the willingness to pay an additional price for imported corncob according to the purchase assertions (Table 9) was significant ($p = 0.002$). The seed variables ($p < 0.000$) and security ($p < 0.035$) were significant for the model, therefore, the willingness to pay an additional price for a creole corncob was higher when the consumer considered it important to know if the seed was creole or modified, as it indicates greater safety for consumption.

The willingness to pay an additional price for each type of corncob is shown in Table 10. Of the consumers, 25% were not willing to pay an additional price for yellow, white and red / purple corncob; these consumers do not consider color an attribute that demonstrates the quality of the corncob. The willingness to pay an additional price of 30% was

que este fuera producido por pequeños productores estuvo dispuesto a pagar un sobreprecio por un elote criollo.

higher in creole, imported and organic corn cob according to 20.79%, 17.13% and 10.96% of consumers.

Cuadro 7. Modelo econométrico de la disposición a pagar extra (%) por un elote criollo según aseveraciones de decisión de compra.

Table 7. Econometric model of the willingness to pay an additional price (%) for a creole corn cob according to the purchase decision assertions.

Parámetros del modelo				
Variable	Efecto marginal	Error estándar	Pr > z	Verosimilitud
Premios/Certificaciones	-0,004	0,012	0,624	$\chi^2 = 34,46$
Seguridad	0,016	0,010	0,069	<i>g.l.</i> = 5,350
Conocimiento	0,007	0,009	0,200	<i>p</i> < 0,0001
Accesibilidad	0,006	0,009	0,252	
Semilla	0,036	0,007	< 0,0001	

Este resultado es similar a lo concluido por Mennecke *et al.*, (2007), quienes estudiaron las preferencias de los consumidores estadounidenses por los atributos de la carne de res mediante el análisis conjunto y encontraron que la región de origen es el atributo más importante para los consumidores, seguido de la raza, la trazabilidad a la granja y la alimentación animal; en los resultados del modelo econométrico, la mayor disposición a pagar por un elote proveniente de semilla criolla es en primer lugar porque sea producido por pequeños productores, importancia del precio, producido localmente y por su calidad asociada.

El modelo econométrico de la disposición a pagar un sobreprecio por elote de importación según las aseveraciones de compra (Cuadro 9) fue significativo ($p = 0,002$); las variables

The willingness to pay between creole and imported corn cob was not significantly different; this is contrary to that reported by Lim *et al.*, (2013), who found that the preferences and willingness of consumers to pay an additional price for local beef steak than for imported beef steak.

The willingness to pay an additional price of 10% did not present a significant difference between the types of corn cob, since this percentage was accessible to consumers, so possibly the attributes or characteristics of the corn cob were not relevant. In general, the results have shown that the willingness of consumers to pay an additional price for corn cob is modest, since it is a popular consumer product in Mexico. Likewise, the willingness to pay a premium is directly related to the experience and information that the consumer possesses (Cao *et al.*, 2020).

semilla ($p < 0.000$) y seguridad ($p < 0,035$) fueron significativas para el modelo; por lo cual, la disposición a pagar un sobreprecio por un elote criollo fue mayor cuando el consumidor consideró importante conocer si la semilla era criolla o modificada y porque le brinda mayor seguridad.

Conclusions

The valuation and willingness to pay an additional price for the corncob, depends mainly on the information that the consumer handles about the origin of the corncob, as well as a production in small farms.

Cuadro 8. Modelo econométrico de la disposición a pagar extra (%) por un elote criollo según características del elote.

Table 8. Econometric model of the willingness to pay an additional price (%) for a creole corncob according to its characteristics.

Parámetros del modelo				
Variable	Efecto marginal	Error estándar	Pr > z	Verosimilitud
Producido localmente	0,006	0,014	0,341	$\chi^2 = 21,57$
Productores	0,028	0,013	0,016	$g.l. = 4,351$
La calidad	0,004	0,014	0,399	$p = 0,000$
El precio	0,018	0,012	0,063	

Cuadro 9. Modelo econométrico de la disposición a pagar extra (%) por un elote de importación según aseveraciones de decisión de compra.

Table 9. Econometric model of the willingness to pay an additional price (%) for an imported corncob, according to the purchasing decision assertion.

Parámetros del modelo				
Variable	Efecto marginal	Error estándar	Pr > z	Verosimilitud
Premios/Certificaciones	-0,016	0,013	0,891	$\chi^2 = 18,59$
Seguridad	0,022	0,012	0,035	$g.l. = 5,350$
Conocimiento	0,002	0,010	0,410	$p = 0,002$
Accesibilidad	0,016	0,011	0,070	
Semilla	0,028	0,008	0,000	

La disposición a pagar un sobreprecio por elote se muestra en el cuadro 10. De los consumidores, 25 % no estuvo dispuesto a pagar un sobreprecio por elotes de color amarillo, blanco y rojo/morado; esto pudo deberse a que esos consumidores no consideran al color un atributo que demuestre la calidad del elote a consumir. La disposición a pagar un sobreprecio de 30 % fue mayor en elotes criollos, de importación y orgánicos con un 20.79 %, 17.13% y 10.96% de los consumidores presentó esta opinión respectivamente.

The socio-demographic characteristics of consumers do not significantly influence the willingness to pay an additional price for corn cob. Creole and imported corn, as well as organic and red / purple corn, showed a greater willingness of consumers to pay an additional price. More than 25% of consumers showed this willingness to pay an additional price for these types of corncob.

The economic valuation of corn by Mexican consumers can be used to improve and reassess their consumption, considering the factors

Cuadro 10. Disposición a pagar (%) un sobreprecio en consumidores por tipo de elote.

Table 10. Willingness of consumers to pay an additional price (%) for each type of corncob.

Tipo de elote	Porcentaje extra a pagar				
	0 %	5 %	10 %	20 %	30 %
Amarillo	35.11 d ^z	31.18 c	20.79 a	9.27 a	3.65 a
Blanco	30.62 cd	28.93 bc	25.56 a	10.67 ab	4.21 a
Rojo/morado	25.56 bcd	28.65 bc	24.72 a	14.33 abc	6.74 ab
Orgánico	22.47 abc	21.91 abc	29.49 a	15.17 abc	10.96 bc
De importación	16.29 ab	19.38 ab	26.97 a	20.22 c	17.13 cd
Criollo	15.17 a	16.57 a	28.94 a	18.54 bc	20.79 d

^z Proporciones con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales ($p \leq 0,05$).

^z Proportions with the same letter within columns are statistically equal $p \leq 0.05$

La disposición a pagar entre elotes criollos y de importación no fue significativamente diferente; contrario a lo reportado por Lim *et al.*, (2013), quienes encontraron que las preferencias y disposición a pagar un sobreprecio de los consumidores son significativamente más altas para

that were significant. Both the Creole and imported corn were highly valued by Mexican consumers and presented a greater willingness of consumers to pay an additional price. However, it is necessary to carry out more studies regarding consumer preferences and provide more elements that

filetes nacionales que para filetes importados.

La disposición a pagar un sobreprecio de 10 % no presentó diferencia significativa entre los elotes; lo cual pudo deberse a que fue considerado un porcentaje accesible para los consumidores, donde quizá no es relevante considerar a detalle los atributos o características del elote. En general, los resultados han demostrado que la disposición a pagar del consumidor es modesta debido a que es un producto de consumo popular en México, y que la disposición a pagar un sobreprecio está directamente relacionada con la experiencia e información que el consumidor posea (Cao *et al.*, 2020).

Conclusiones

La valoración y disposición a pagar un sobreprecio por elotes, depende principalmente de la afinidad que presenta el consumidor con el conocimiento del origen del elote, así como de una producción a pequeña escala.

Las características sociodemográficas de los consumidores no son variables que influyen significativamente en la disposición a pagar un extra por elotes. Los elotes criollos y de importación presentaron una mayor disposición a pagar un sobreprecio, así como los elotes orgánicos y de color rojo/morado, al presentar una disposición mayor a 25 % de los consumidores.

La valoración económica de elotes por consumidores mexicanos puede ser empleada para inducir y revalorar

allow the revaluation of Creole corn and strengthen the identity of an emblematic product such as corn and its consumption as a corncob.

Funding Source

This research was funded through the project “Transfer of technology and innovations in the chains of cheeses, corncob and mezcal (18026-DTT-62)”, of the General Directorate of Research and Postgraduate Studies of the Universidad Autónoma Chapingo.

End of English Version

su consumo, considerando los factores que resultaron significativos. Los elotes criollos fueron bien valorados por los consumidores mexicanos y presentaron una mayor disposición a pagar un sobreprecio, sin embargo, al resultar estadísticamente igual la disposición a pagar respecto a los elotes de importación, es necesario realizar más estudios respecto a las preferencias del consumidor y proporcionar más elementos que permitan la revaloración de los elotes criollos y fortalecer la identidad de un producto emblemático como el maíz y su consumo en elote.

Fuente de financiamiento

Esta investigación fue financiada mediante el proyecto “Transferencia de tecnología e innovaciones en las cadenas de quesos, elotes y mezcal (18026-DTT-62)”, de la Dirección General de Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma Chapingo.

Literatura citada

- Annur, N.D., B.S.H. Nugrohoningtyas, M.C. Rodríguez-Dodero and W. Setyaningsih. 2020. Consumers' willingness to pay for functional rice: A survey from Indonesia. *Food Research*, 4(4):1344-1350.
- Aschemann-Witzsel, J., N. Maroscheck and U. Hamm. 2013. Are organic consumers preferring or avoiding foods with nutrition and health claims. *Food Qual. Prefer.* 30(3):68-76.
- Bentivoglio, D., A. Finco, G. Bucci and G. Staffolani. 2020. Is there a promising market for the A2 milk? analysis of Italian consumer preferences. *Sustainability* (Switzerland), 12(17).
- Bilal, M. and D. Lal. 2019. Indian consumers' attitudes towards purchasing organically produced foods: An empirical study. *J. Clean. Prod.* 215:99-111.
- Boncinelli, F., A. Dominici, F. Gerini and E. Marone. 2019. Consumers wine preferences according to purchase occasion: Personal consumption and gift-giving. *Food Qual. Prefer.* 71:270-278.
- Cao, Y.J., J. Cranfield, C. Chen and T. Widowski. 2020. Heterogeneous informational and attitudinal impacts on consumer preferences for eggs from welfare enhanced cage systems. *Food Policy*. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2020.101979>
- Cerdan, C., D. Vitrolles, G. Mascarenhas et J. Wilkinson. 2011. La mise en politique des indications géographiques et du terroir au Brésil: principaux défis et perspectives. *In: C. Delfosse (Ed.). La mode du terroir et les produits alimentaires*. p. 323-346.
- Dal Bianco, A., V. Boatto, S. Trestini and F. Caracciolo. 2018. Understanding consumption choice of Prosecco wine: an empirical analysis using Italian and German Homescan data. *Int. J. Wine Res.* 29(3):190-203.
- Delmond, A.R., J.J. Mccluskey, M. Yormirzoev and M.A. Rogova. 2018. Russian consumer willingness to pay for genetically modified food. *Food Policy* 78:91-100.
- Fernández, I., J.L. Jaramillo, J.A. Hernández, y P. Cadena. 2014. Evaluación agronómica y sensorial de ocho genotipos de maíz (*Zea mays L.*) para la producción de elote. *Agro-Productividad* 7(6): 47- 51.
- FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura). 2016. Panorama Agroalimentario. Maíz 2016. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial. México. 41 pp.
- He, C., L. Shi, Z. Gao and L. House. 2020. The impact of customer ratings on consumer choice of fresh produce: A stated preference experiment approach. *Canadian Journal of Agricultural Economics*, 68(3):359-373.
- Konuk, F.A. 2019. Consumers' willingness to buy and willingness to pay for fair trade food: The influence of consciousness for fair consumption, environmental concern, trust and innovativeness. *Food Res. Int.* 120:141-147.
- Lanfranchi, M., E. Schimmenti, M.G. Campolo and C. Giannetto. 2019. The willingness to pay of Sicilian consumer for a wine obtained with sustainable production method: an estimate through an ordered probit sample-selection model. *Wine Economics and Policy*. 8(2):203-215
- Lim, K.H., W. Hu, L.J. Maynard and E. Goddard. 2013. U.S. Consumers' preference and willingness to pay for country-of-origin-labeled beef steak and food safety enhancements. *J. Agric. Econ.* 61(1):93-118.
- Liu, R., Z. Gao, R.M. Nayga, H.A. Snell and H. Ma. 2019. Consumers' valuation for food traceability in China: Does trust matter? *Food Policy*, 88.
- Loureiro, M.L. and S. Hine. 2002. Discovering Niche Markets: a comparison of consumer willingness to pay for local (Colorado Grown), Organic, and GMO-Free products. *J. Agric. Appl. Econ.* 34(3):477-487.

- Lu, J., H. Wang, L. Wu and X. Chen. 2020. Traceability information and willingness to pay: The case of Pork. *Singapore Economic Review*, 65(3):737-754.
- Martínez, G.J. y C.L. Martínez. 2008. Determinación de la máxima varianza para el cálculo del factor de imprecisión sobre la escala de medida, y extensión a diferentes tipos de muestreo. *Psicothema*, 20(2):311-316.
- Mennecke, B.E., A.M. Townsend, D.J. Hayes, and S.M. Lonergan. 2007. A study of the factors that influence consumer attitudes toward beef products using the conjoint market analysis tool. *J. Anim. Sci.* 85(10):2639-2659.
- Ortiz-Torres, E., P.A. López, A. Gil-Muñoz, J.D. Guerrero-Rodríguez, H. López Sánchez, O.R. Taboada-Gaytán, J.A. Hernández-Guzmán y M. Valadez Ramírez. 2013. Rendimiento y calidad de elote en poblaciones nativas de maíz de Tehuacán, Puebla. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 19(2):225-238.
- Pomarici, E., M. Lerro, P. Chrysochou, R. Vecchio, and A. Krystallis. 2017. One size does (obviously not) fit all: Using product attributes for wine market segmentation. *Wine Econ. Policy* 6(2):98-106.
- Romero-Padilla, A., M. Hernández-Juárez, O.A. Arana-Coronado, R.C. García-Sánchez, J. Malaga, y E. Segarra. 2014. Impacto de la producción de biocombustible en Estados Unidos en el mercado de maíz (*Zea mays* L.) en México. *Agrociencia* 48(6):653-665.
- Rousseau, S., and L. Vranken. 2013. Green market expansion by reducing information asymmetries: Evidence for labeled organic food products. *Food Policy*. 40:31-43.
- Thorne, F., J. A. S. Fox, E. Mullins and M. Wallace. 2017. Consumer willingness-to-pay for genetically modified potatoes in Ireland: An experimental auction approach. *Agribusiness*, 33(1), 43-55.
- Van Kleef, E., H.C.M. Van Trijp and P. Luning. 2005. Consumer research in the early stages of new product development: A critical review of methods and techniques. *Food Qual. Prefer.* 16:181-201.
- Wu, L., S. Wang, D. Zhu, W. Hu and H. Wang. 2015. Chinese consumers' preferences and willingness to pay for traceable food quality and safety attributes: The case of pork. *China Econ. Rev.* 35: 121-136.
- Xie, J., Z. Gao, M. Swisher, & X. Zhao. 2016. Consumers' preferences for fresh broccolis: Interactive effects between country of origin and organic labels. *Agricultural Economics*, 47(2):181-191.
- Xu, L., X. Yang, L. Wu, X. Chen, L. Chen and F. Tsai. 2019. Consumers' willingness to pay for food with information on animal welfare, lean meat essence detection, and traceability. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(19).
- XLSTAT, Software. 2014. Data Analysis and Statistical Solution for Microsoft Excel, Addinsoft, Paris, France 2017. Disponible en: <https://www.xlstat.com>
- Yin, S., W. Hu, Y. Chen, F. Han, Y. Wang and M. Chen. 2019. Chinese consumer preferences for fresh produce: Interaction between food safety labels and brands. *Agribusiness*, 35(1):53-68.