

2021  
38:3



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

Julio-Septiembre



**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)**

*Dr. Gilberto Vizcaíno*  
Coordinador-  
Secretario

**Editor Jefe**

Dr. Jorge Vilchez-Perozo.  
2018-2023.  
jvilchezp@fa.luz.edu.ve  
jv.revfacagron@gmail.com  
Universidad del Zulia.  
Maracaibo, Venezuela.

**Editor Adjunto**

MSc. Juan Vergara Lopez  
2018-2023.  
jvergara@fa.luz.edu.ve  
editor.asociado.rfa.luz@gmail.com  
Universidad del Zulia.  
Maracaibo, Venezuela.

**Mejoramiento animal**

Luis Fabian Yañez  
Zuleima Chirinos  
Gonzalo Martínez

**Nutrición animal**

Antonio Landeta  
Omar Araujo Febres  
José M. Luginbuhl

José Palma G.  
Ana María Arzalluz

**Reproducción animal**

Armando Quintero  
Rafaela Muñoz  
German Portilla

Ninoska Madrid  
**Ovinos y caprinos**  
Luis Dickson

**Plátanos y bananas**  
Vianel Rodríguez

**Biometría**

Angel Gómez  
Jorge Ortega  
Belkis Bracho

Cioly Colmenares  
**Fito protección**  
Mauro Albarracín

Nelly Delgado  
José V. Lasso

**Tecnología de alimentos**  
Silvia Araujo  
Zulay Mármol  
Natalia González

**Ferrocultivara**  
Eduardo China  
Danny García

**Frutales**  
Angel Villegas Monter  
Dámaso Bautista

Freddy Leal  
Thomas Osuna

Alimentación  
Reinaldo Pire

Orlando Rodríguez  
Eduardo Sergent

**Leguminosas**  
Cecilia Peña Valdivia  
Atilio Higuera

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,  
North Carolina  
Estados Unidos  
Universidad de Colima, México  
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 - Lara, Venezuela

Instituto Nacional de Investigaciones  
Agrícolas - Lara, 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  
Centro de Investigación en  
Alimentación y Desarrollo AC - México

Universidad de la Laguna, España  
Instituto Nacional de Investigaciones  
Agrícolas -Trujillo, Venezuela

Colegio de Postgraduados, México  
Universidad Centrocidental Lisandro  
Alvarado, Venezuela

Universidad Central de Venezuela,  
Venezuela

Centro de Investigación en  
y Desarrollo AC - México  
Universidad Centrocidental Lisandro  
Alvarado, Venezuela

Universidad Centrocidental Lisandro  
Alvarado, Venezuela

Universidad Central de Venezuela,  
Venezuela

Colegio de Postgraduados, México  
Universidad del Zulia, Venezuela

**Editor Adjunto**

MSc. Evelyn Pérez-Pérez.  
2019-2024 edcpp.revfacagron@gmail.com  
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.  
MSc. Beltran Briceño  
2019-2024 beltranbriceño@fa.luz.edu.ve. bbr.revfacagron@gmail.com  
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.  
Dra. Lilia Urdaneta  
2020-2025.lurdaneta@fa.luz.edu.ve. liliaurdaneta@hotmail.com  
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela  
Dra. Rosa Razz-García.  
2017-2020. rrazz@fa.luz.edu.ve. rosarazz@hotmail.com  
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.  
Dra. Gretty Etienne-Rojas.  
2017-2020. getienne@fa.luz.edu.ve. getienne26@gmail.com  
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.  
MSc. Andriana Garcia  
2019-2024 andregarcia@fa.luz.edu.ve. andregarcia@fa.luz.edu.ve. andregarcia@fa.luz.edu.ve. andregarcia@gmail.com  
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.  
Dra. Fátima Urdaneta Ortega.  
2019-2024. fatimaurdaneta@fa.luz.edu.ve. fatimaurdaneta@gmail.com  
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

**Producción vegetal**

**Producción vegetal**

**Producción vegetal**

**Producción animal**

**Tecnología de alimentos**

**Tecnología de alimentos**

**Socioeconomía**

**Comité Asesor, año 2021**

**Botánica**

Adriana Sanchez  
Elizabeth Cardenas  
Darisol Pacheco  
María Elena Sanabria

Universidad del Zulia, Venezuela  
Colegio de Postgraduados, México  
Universidad del Zulia, Venezuela  
Universidad Centrocidental Lisandro  
Alvarado, Venezuela

**Bioteconología vegetal**

Zenaida Vilorio  
Solvia León de Sieratta  
Ariadne Vargas

Universidad de Kentucky  
Universidad del Zulia, Venezuela  
Universidad Central de Venezuela,  
Venezuela

**Mejoramiento de plantas**

Alberto Pérez  
Edicta Reyes

Instituto Nacional de Investigaciones  
Agrícolas - Portuguesa, Venezuela  
Instituto Nacional de Investigaciones  
Agrícolas - Portuguesa, Venezuela

**Fitopatología**

Ana M. Cassasa-Padrón  
Renato Crozzoli

Universidad del Zulia, Venezuela  
Universidad Central de Venezuela,  
Venezuela

Alba Nava Pereira  
Francisco Ochoa  
Dorian Rodríguez

Universidad del Zulia, Venezuela  
Universidad de Florida, Estados Unidos  
Universidad Centrocidental Lisandro  
Alvarado, Venezuela

Gustavo Trujillo

Universidad Central de Venezuela,  
Venezuela

**Fisiología vegetal**

Carlos Trejo  
Douglas Marín

Colegio de Postgraduados, México  
Universidad Central de Venezuela,  
Venezuela

José Mejías  
Ramon Jaime  
Mercedes de Serpa

Universidad Central de Venezuela,  
Venezuela  
Universidad de los Andes, Venezuela  
Universidad Centrocidental Lisandro  
Alvarado, Venezuela

**Fisiología post cosecha**

Reginaldo Báez  
Juan Manzano

Centro de Investigación en  
Alimentación y Desarrollo AC - México  
Universidad Centrocidental Lisandro  
Alvarado, Venezuela

Judith Zambrano  
María Elena Peña  
Eduardo Delgado

Universidad de los Andes, Venezuela  
**Socioeconomía y sistemas de producción**  
Universidad del Zulia, Venezuela  
Instituto Nacional de Investigaciones  
Agrícolas - Barinas, Venezuela

Isneira Huerta  
María Alexandra Alizo  
Miguel Crespo

Universidad Nacional Experimental  
Rafael María Barón, Venezuela  
Universidad del Zulia, Venezuela  
Universidad Autónoma de la Laguna,  
México

**Suelos**  
Pedro Betancourt

Instituto Nacional de Investigaciones  
Agrícolas - Lara, Venezuela

Nestor Noguera  
Stalin Torres

Universidad del Zulia, Venezuela  
Universidad Central de Venezuela,  
Venezuela

**Ambiente**  
Ana Isabel Valenzuela

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@fa.luz.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 3. Julio-Septiembre, 2021

---

---

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

Science Citation Index (SCIEExpanded)  
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, Julio-Septiembre 2021 Vol 38 Número 3. Págs. 462-750.

## Índice

---

### Producción Vegetal, Plant Production

---

#### **Effect of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. on the physiology of Pea (*Pisum sativum* L.)**

Efecto de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. sobre la fisiología de guisantes (*Pisum sativum* L.)

Kashifa Noureen, Khajista Jabeen, Sumera Iqbal, Summera Jahan and Sumera Javad

**462-479**

#### **Critical indexes of compositional nutrient diagnosis (CND) and its validation in wheat fields**

Índices críticos de diagnóstico de nutrientes composicionales (CND) y su validación en campos de trigo

Abolfazl Geiklooi, Adel Reyhanitabar and Nosratollah Najafi

**480-504**

#### **Late blight resistance of Ecuadorian potato landraces: field evaluation and farmer's perception**

Resistencia a lancha de papas nativas ecuatorianas: evaluación en campo y percepción de agricultores

Álvaro Monteros- Altamirano and Ricardo Delgado

**505-524**

#### **Mineralización de nitrógeno en suelos cultivados con plátano (*Musa* AAB Subgrupo plátano cv. Hartón), estado Zulia, Venezuela**

Nitrogen mineralization in soils cultivated with plantain (*Musa* AAB Subgroup plátano cv. Hartón), Zulia state, Venezuela

Ana Francisca González-Pedraza y Juan Carlos Escalante

**525-547**

#### **Evaluación de la sequía meteorológica en locaciones agrícolas de Venezuela bajo proyecciones futuras de cambio climático**

Assessment of meteorological drought in agricultural locations from Venezuela under future projections of climate change

Miguel I. Silva Borges y Naghely M. Mendoza D.

**548-572**



## **Technical note / Nota Técnica**

### **Respuesta agroproductiva de *Zea mays* L. con la aplicación foliar de VIUSID agro®**

Agroproductive response of *Zea mays* L. with the foliar application of VIUSID agro®

Kolima Peña, Alexander Calero-Hurtado, Dilier Olivera- Vicedo, Juan Carlos Rodríguez, Thiago Fernandes, Rainer García y Gabriela Ajila

**573-584**

### **Complejos virales en la interacción *Allium cepa* L.-*Frankliniella occidentalis* P., por DAS-ELISA en Baja California, México**

Viral complexes in the *Allium cepa* L.- *Frankliniella occidentalis* P. interaction by DAS-ELISA in Baja California, Mexico

Raúl Enrique Valle-Gough, Blanca Yesenia Samaniego- Gámez, Lourdes Cervantes-Díaz, Samuel Uriel Samaniego- Gámez, René Garruña-Hernández, Fidel Núñez-Ramírez, Esaú Ruiz-Sánchez y Ariana Isabel Torres-Bojórquez

**585-607**

### **Cyclical response of maize populations versus base population and standard genotypes across environments**

Respuesta cíclica de las poblaciones de maíz frente a la población base y los genotipos estándar en todos los entornos

Mohammad Sajjad, Naqib Ullah Khan, Samrin Gul, Shahid Ullah Khan , Zarina Bibi, Sardar Ali, Sher Aslam Khan, Naushad Ali, Iqra Tahir, Amina Habib and Ijaz Hussain

**608-630**

### **Physiological and root morphological responses indifferent combinations of rootstock-scion of cacao to water deficit**

Respuestas fisiológicas y morfológicas de raíces en diferentes combinaciones de patrones e injertos de cacao al déficit hídrico

Ramón Jaimez, Gregorio Vásquez, Ignacio Sotomayor, Grisnel Quijano, Jaime Morante, Francisco Arteaga and George Cedeño-García

**631-651**

## **Nota técnica / Technical note**

### **Diversidad y distribución de nematodos fitoparásitos en campos de golf en localidades de Baja California Sur, México**

Diversity and distribution of plant parasitic-nematodes on golf courses in localities of Baja California Sur, Mexico

Omar Jorge Sánchez-Arce, Alejandro Palacios-Espinosa, José Armando Carillo-Fasio, Luis Guillermo Hernández-Montiel, José Saúl Hernández-Rubio y Mirella Romero-Bastidas

**652-661**

### **Dinámica de la vegetación y variabilidad pluviométrica en la cuenca del río Portoviejo**

Vegetation dynamics and climate variability in the Portoviejo river basin

Karol K. Cuenca Zambrano y Henry A. Pacheco Gil

**662-680**

---

## Producción Animal, Animal Production

---

### Nota técnica /Technical note

#### Efecto del método de extracción de líquido ruminal en la técnica de gas *in vitro*

Effect of the ruminal liquid extraction method in the *in vitro* gas technique

Roselia Ramírez Díaz, René Pinto Ruiz, Francisco Guevara Hernández, José Apolonio Venegas Venegas, Mariela Beatriz Reyes Sosa y Luis Alberto Miranda Romero

681-691

---

## Tecnología de Alimentos, FoodTechnology

---

### Elaboration of carbonated beverages with sucralose from eggplant

Elaboración de bebida gaseosa con sucralosa a partir de jugo de berenjena

Nelson Loyola Lopez, Carlos Acuña Carrasco, Leonardo Arenas Bravo and Mariela Arriola Herrera

692-717

---

### Nota técnica / Technical note

#### Sacarificación y fermentación de los residuos lignocelulósicos de la naranja para la obtención de bioalcohol

Saccharification and fermentation of the lignocellulosic residues of the orange to obtain bioalcohol

Pablo Enrique Alcívar-Mendoza, José Patricio Muñoz-Murillo, Christhel Alejandra Andrade-Díaz y Alex Alberto Dueñas-Rivadeneira

718-732

---

## Socioeconomía, Socioeconomics

---

### Preferencias hacia la marca y origen del ajo (*Allium sativum*L.)

Preferences towards the brand and origin of garlic (*Allium sativum*L.)

Alma Teresita Velarde-Mendivil, Dena María Camarena- Gómez y Lizbeth Salgado-Beltrán




733-750

## Effect of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. on the physiology of Pea (*Pisum sativum* L.)

Efecto de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. sobre la fisiología de guisantes (*Pisum sativum* L.)

Efeito da *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. na fisiologia das ervilhas (*Pisum sativum* L.)

Kashifa Noureen<sup>1</sup>, Khajista Jabeen<sup>1\*</sup>, Sumera Iqbal<sup>1</sup>,  
Summera Jahan<sup>1,2</sup> and Sumera Javad<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Botany, Lahore College for Women University, Jail Road, Lahore, Pakistan. Email: (KN) [wasif\\_naseer@yahoo.com](mailto:wasif_naseer@yahoo.com); (KJ) [khajista\\_1@hotmail.com](mailto:khajista_1@hotmail.com),  (SI) [sumeraiqbal2@yahoo.com](mailto:sumeraiqbal2@yahoo.com),  (SJ) [aremmus\\_jahan@yahoo.com](mailto:aremmus_jahan@yahoo.com), (SJ) [zif\\_4@yahoo.com](mailto:zif_4@yahoo.com), .

<sup>2</sup>Department of Botany, University of Gujrat, Gujrat, Pakistan.

### Abstract

*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. is responsible for causing leaf spots and blight diseases on a large number of horticultural and agricultural crops including pea. The response and resistance of different pea varieties to this fungus might vary. Therefore, this study was aimed to investigate the varietal differences in the physiological response of *Pisum sativum* L. to *A. alternata*. Various physiological and biochemical parameters of two commercial pea varieties (Leina and Meature) were assessed at vegetative stage in pot experiment. Sterilized seeds were soaked in  $1 \times 10^5$  mL conidial suspension of *A. alternata* for 15 min and control seeds were soaked in sterilized water. These sterilized seeds were sown in pots containing sterilized soil. In both varieties, germination percentage, germination rate, seedling vigor index, root and shoot length, dry and fresh biomass, leaf sugar, chlorophyll *a*, *b*, total chlorophyll and carotenoid contents, leaf osmotic potential, leaf relative water content, significantly decreased under *A. alternata* stress as compared to control. But proline and protein content significantly increased. It is concluded from the results that *A. alternata* caused adverse effects on the physiology of pea plant. The tested pea variety Leina was found to be more sensitive under fungal stress of *A. alternata* as compared to Meature and the extent of stress caused by both test varieties can be exploited in future studies.

**Keywords:** biotic stress, biochemical, blight, germination, pot experiment.

Received el 15-01-2018 • Accepted el 17-12-20.

\*Corresponding author. E-mail: [khajista\\_1@hotmail.com](mailto:khajista_1@hotmail.com)

## Resumen

*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. es responsable de causar manchas foliares y enfermedades de tizón en una gran cantidad de cultivos hortícolas y agrícolas, incluido el guisante. La respuesta y resistencia de diferentes variedades de guisantes a este hongo puede variar. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue investigar las diferencias varietales en la respuesta fisiológica de *Pisum sativum* L. a *A. alternata*. Varios parámetros fisiológicos y bioquímicos de dos variedades comerciales de guisantes (Leina y Meature) fueron evaluadas en etapa vegetativa en macetas experimentales. Semillas estériles se humedecieron durante 15 min con una suspensión de  $1 \times 10^5$  mL de conidios de *A. alternata* y las semillas de control se humedecieron con agua estéril. Estas semillas se sembraron en macetas que contenían tierra estéril. En ambas variedades el porcentaje de germinación, tasa de germinación, índice de vigor de plántulas, longitud de raíz y brote, biomasa seca y fresca, azúcar de hoja, contenido de clorofila *a* y *b*, contenido de clorofila total y de carotenoides, potencial osmótico foliar, contenido relativo de agua foliar, disminuyeron significativamente en *A. alternata* estresada en comparación con el control. Pero el contenido de prolina y proteínas aumentó significativamente. Se concluye de estos resultados que *A. alternata* causó efectos adversos en la fisiología de la planta de guisantes. Se encontró que la variedad de guisantes Leina es más sensible bajo el estrés fúngico de *A. alternata* en comparación con Meature y el grado de estrés causado por ambas variedades de prueba puede ser aprovechadas en estudios futuros.

**Palabras clave:** estrés biótico, bioquímica, tizón, germinación, experimento en maceta.

## Resumo

*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. é responsável por causar manchas de folhas e doenças de pragas em um grande número de culturas hortícolas e agrícolas, incluindo ervilha. A resposta e resistência de diferentes variedades de ervilhas a este fungo pode variar. Por isso, este estudo teve como objetivo investigar as diferenças varietal na resposta fisiológica de *Pisum sativum* L. a *A. alternata*. Vários parâmetros fisiológicos e bioquímicos de duas variedades comerciais de ervilha (Leina e Meature) foram avaliados em estágio vegetativo no experimento de maconha. Asementes terilizadas foram embebidas em  $1 \times 10^5$  mL de suspensão concisal de *A. alternata* por 15 min e as sementes de controle foram encharcadas em água esterilizada. Estas sementes esterilizadas foram semeadas em vasos contendo solo esterilizado. Em ambas as variedades, percentual de germinação, taxa de germinação, índice de vigor de mudas, comprimento de raiz e tiro, biomassa seca e fresca, açúcar de folha, clorofila *a*, *b*, teor total de clorofila e carotenoide, potencial osmótico de folhas, teor de água relativa da folha, diminuiu significativamente sob estresse *alternata* em comparação com o controle. Mas o teor de prolina e proteína

umentou significativamente. Conclui-se a partir dos resultados que *A. alternata* causou efeitos adversos na fisiologia da planta de ervilha. A variedade de ervilha testada Leina foi encontrada mais sensível sob o estresse fúngico de *A. alternata* em comparação com Meature e a extensão do estresse causado por ambas as variedades de teste pode ser explorada em estudos futuros.

**Palavras-chave:** estresse biótico, bioquímico, praga, germinação, experimento de maconha

## Introduction

Pea (*Pisum sativum* L.) belongs to the Fabaceae family. It is an important vegetable crop which grows worldwide in the tropical areas. Pea contributes about one-third of humankind's direct protein intake, while also serving as an important source of fodder and forage for animals and of edible and industrial oils. Economically, legumes represent the second most important family of crop plants after Poaceae. Pea seeds are rich in protein, starch, sugars, fibers, minerals, and vitamins. Due to its nutritional and economic importance it is cultivated worldwide. One the most important attributes of legumes is their capacity for symbiotic nitrogen fixation, underscoring their importance as a source of nitrogen in both natural and agricultural ecosystems. In Pakistan pea average yield is about 178231 t.ha<sup>-1</sup> and it is the lowest among other pea cultivating countries and cannot fulfill the demand of the country (FAO, 2018).

Various pests, bacteria, fungi, viruses, and other insects damage crop plants during different stages of their development and growth (Tapwal *et al.*, 2011). Fungal plant pathogens are responsible for drastic annual losses in crop production and yield. It has

## Introducción

El guisante (*Pisum sativum* L.) pertenece a la familia Fabaceae. Es un cultivo vegetal importante que crece en las áreas tropicales de todo el mundo. El guisante aporta aproximadamente un tercio de la ingesta proteica directa de la humanidad, al mismo tiempo que sirve como una fuente importante de forraje para animales y de aceites comestibles e industriales. Económicamente, las legumbres representan la segunda familia más importante del cultivo de plantas después de las Poaceae. Las semillas de guisantes son ricas en proteínas, almidón, azúcares, fibras, minerales, y vitaminas. Debido a su importancia nutricional y económica es cultivado en todo el mundo. Uno de los atributos más importantes de las legumbres es su capacidad para la fijación simbiótica de nitrógeno, resaltando su importancia como fuente de nitrógeno tanto en ecosistemas naturales como agrícolas. En Pakistán, el rendimiento promedio del guisante es de aproximadamente 178231 t.ha<sup>-1</sup> y es el más bajo entre otros países productores de guisantes y no puede satisfacer la demanda del país (FAO, 2018).

been estimated that the major crops suffer from more than 70% of diseases caused by fungi (Agrios, 2005). Many plant pathogens like *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *F. oxysporum* and *A. alternata* are the major cause of scrupulous damage to agriculture crops at pre and post-harvest stages (Hadizadeh *et al.*, 2009).

Members of genus *Alternaria* are drastic fungal plant pathogens that cause diseases on aerial parts of plants and affect the process of photosynthesis which in turn affects yield and production (Meena *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014). *Alternaria* is widely distributed in many food and feed crops as well as in soil, household dust and decaying organic material (Aneja and Agnihotri, 2013). *Alternaria alternata* is responsible for causing leaf spots and blight diseases on a large number of horticultural and agricultural crops including pea, potato and tomato (Yang *et al.*, 2013; Rodino *et al.*, 2014). Regarding the changes in the physiology of pea plant by *Alternaria* blight, the lesions appears after infection on the leaves and other aerial parts severely damage by reduction in photosynthesis rate. The reduction in photosynthesis was led to low respiration rate and ultimately the plant growth retarded (Fondevilla *et al.*, 2005). *Alternaria* spp. produces variety of secondary metabolites which induce cytotoxic and phytotoxic effects in pea plant (Hadi, 2019).

Therefore the present study was aimed to evaluate the impact of *A. alternata* on the physiology and biochemistry of two local pea varieties of Pakistan.

Varias plagas, bacterias, hongos, virus, y otros insectos, dañan los cultivos de las plantas durante las diferentes etapas de su desarrollo y crecimiento (Tapwal *et al.*, 2011). Los patógenos fúngicos de las plantas son responsables por las pérdidas drásticas anuales en la producción de cultivo y su rendimiento. Se ha estimado que más del 70% de las enfermedades que afectan los principales cultivos son causadas por hongos (Agrios, 2005). Muchos patógenos de plantas como *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *F. oxysporum* y *A. alternata* son la principal causa del daño severo a cultivos agrícolas en las etapas de pre y post cosecha (Hadizadeh *et al.*, 2009).

Los miembros del género *Alternaria* son patógenos fúngicos drásticos de plantas que causan enfermedades en las partes aéreas de las plantas y que afectan el proceso de fotosíntesis, lo que a su vez perjudica el rendimiento y la producción (Meena *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014). *Alternaria* está ampliamente distribuida en muchos cultivos, así como en el suelo, el polvo doméstico y el material orgánico en descomposición. (Aneja y Agnihotri, 2013). *Alternaria alternata* es responsable de causar manchas en las hojas y enfermedades de tizón en un gran número de cultivos hortícolas y agrícolas, incluyendo guisantes, patatas y tomates (Yang *et al.*, 2013; Rodino *et al.*, 2014). Con respecto a los cambios en la fisiología de la planta de guisante por el tizón de *Alternaria*, las lesiones aparecen después de la infección en las hojas, y en las otras partes áreas se daña severamente

## Materials and methods

The experiment was conducted in Lahore College for Women University Lahore, Pakistan, during the pea crop growing season. Seeds of two varieties of Pea plant Leina and Meature were collected from National Vegetable Seed Development Program, NARC Islamabad, Pakistan. The test fungus *Alternaria alternata* (accession # FCBP-1071) was procured from Fungal Culture Bank University of the Punjab, Lahore, Pakistan. The experiment was laid down as randomized complete block design and in each block control and experimental pots were placed in completely randomized way in 6 blocks and each 4 pots, two control and two experimental. The seeds were surface sterilized with 0.2% mercuric chloride solution for five minutes to stop any microbial infection and then thoroughly rinsed with distilled water for three times. For conducting pot experiment, sterilized seeds of both test varieties of pea were soaked into  $1 \times 10^5$  mL conidial suspension of *A. alternata* for 15 min and control seeds were only in sterilized water. Plastic pots of 30 cm diameter were filled with 10 kg of sterilized soil in each pot and ten seeds per pot were initially sown. Two sets of pots were maintained one contains fungus inoculated seeds and the second set was with only surface sterilized seeds (Younas *et al.*, 2016).

la planta por reducción en la tasa de fotosíntesis. La reducción en la fotosíntesis condujo a una tasa de respiración baja y, en última instancia, se retrasó el crecimiento de la planta (Fondevilla *et al.*, 2005). *Alternaria* spp. produce una variedad de metabolitos secundarios que inducen efectos citotóxicos y fitotóxicos en la planta de guisantes (Hadi, 2019).

Por lo tanto la presente investigación estuvo dirigida a evaluar el impacto de *A. alternata* en la fisiología y bioquímica de dos variedades locales de guisantes de Pakistán.

## Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en Lahore College for Women University Lahore, Pakistán, durante la temporada de siembra de cultivo de guisantes. Semillas de dos variedades de guisante Leina y Meature fueron recolectadas de Leina y Meature Islamabad, Pakistán. El test del hongo *Alternaria alternata* (accesión # FCBP-1071) fue adquirido por Fungal Culture Bank University of The Punjab, Lahore, Pakistán.

El experimento se planteó como un diseño de bloques completamente al azar, siendo 6 bloques cada uno conteniendo 4 macetas, dos de control y dos experimentales. Las semillas se esterilizaron superficialmente con una solución de cloruro de mercurio al 0,2% durante cinco minutos para detener cualquier infección microbiana y luego se enjuagaron minuciosamente con agua destilada tres veces. Para realizar el experimento en macetas, las semillas esterilizadas de ambas variedades de



Germination was recorded at daily basis by counting the number of seed germinated in every Pot. After fifteen days of germination the plants were thinned to five plants per pot. The germination rate was determined by the formula (Mostafavi, 2011).

$$GR = \frac{\Sigma N}{\Sigma(n \times g)}$$

The germination percentage was determined by the formula,

$$GP = (SNP/SNO) 100\%$$

Twelve days after seed sowing three seedlings from each of the Pot were randomly selected for fresh, dry weight and seed vigor index determination. Rootlet and shootlet lengths were measured with ruler in cm. The seed vigor index was determined by using the formula given by Abdul-Baki and Anderson (1973).

Seed Vigor Index= Germination percentage Seedling length

Plants of both sets were observed daily, up to 40 days, to record the development of *A. alternata* blight disease by visualizing and counting the total diseased plants in each pot. Sampling was done at vegetative stage after 40 days of sowing and the surviving plants were uprooted, washed in tap water to remove soil particle and kept immersed in tap water till observation. After weighing five plants samples were stored at -20°C in refrigerator till further analysis proceeded. Later these samples were used to estimate the osmotic potential of the leaves cell sap with a vapor pressure Osmometer following the method of Capell and Dörffling (1993) by using the following formula:

guisantes de prueba se empaparon en 1 x 10<sup>5</sup> mL de suspensión de conidios de *A. alternata* durante 15 min y las semillas de control solo estaban en agua esterilizada.

Las macetas plásticas de 30 cm de diámetro fueron llenadas con 10 kg de suelo esterilizado en cada maceta y 10 semillas por maceta fueron sembradas inicialmente. Se mantuvieron dos juegos de macetas, uno contenía semillas inoculadas con hongos y el otro contenía semillas esterilizadas (Younas *et al.*, 2016).

La germinación se registró diariamente por el conteo del número de semillas germinadas en cada maceta. Después de quince días de germinación, las plantas se redujeron a cinco plantas por maceta. La tasa de germinación se determinó mediante la fórmula (Mostafavi, 2011).

$$GR = \frac{\Sigma N}{\Sigma(n \times g)}$$

El porcentaje de germinación fue determinado por la fórmula:

$$GP = (SNP/SNO) 100\%$$

Veinte días después de la siembra de las semillas, tres plántulas de cada maceta fueron seleccionadas aleatoriamente para la determinación de peso fresco, seco e índice de vigor de la semilla. Se midieron las longitudes de las raíces y de los brotes con una regla milimetrada. El índice de vigor de la semilla se determinó mediante la fórmula proporcionada por Abdul-Baki y Anderson (1973).

Índice de vigor de la semilla= Porcentaje de germinación x Longitud de las plántulas.



Osmotic potential = -osmolality (mosmol)  $\times 0,831 \times 10^{-5} \times T$  (K).

Relative water content (RWC) of both control and infected pea leaves (leaves of five plants for each treatment) were calculated according to the method of Weatherley (1950).

$RWC = [(fresh\ mass - dry\ mass) / (saturated\ mass - dry\ mass)] \times 100$

Sugar content of leaves of five plants of both control and experimental was determined following the method of Dubois *et al.* (1956). Proline content of leaves samples was estimated following the method of Bates *et al.* (1973). Protein content of leaves was estimated following the method of Lowry *et al.* (1951).

To estimate chlorophyll and carotenoid contents Hiscox and Israelstam (1979) method was used. Chlorophyll *a*, *b* and total chlorophyll were calculated by Arnon's formula (1949). Carotenoid content was estimated according to the method of Lichtenthaler and Wellburn (1983).

The data of the research study was evaluated by using ANOVA and Duncan's Multiple Range Test (DMRT) was used to compare the mean values.

## Results and discussion

Effects of *A. alternata* on the germination parameters and physiology of pea are revealed as follows, significant lower germination percentage and germination rate in *A. alternata* treated seeds was observed in both varieties Leina and Meature as compared to control (figure 1A and B). Infected leaves of 'Leina' and 'Meature' varieties of pea plant

Plantas de ambos juegos fueron observadas diariamente hasta 40 días, para registrar el desarrollo de la enfermedad del tizón de *A. alternata* por visualización y conteo del total de plantas enfermas en cada maceta. El muestreo fue realizado en etapa vegetativa después de 40 días de siembra y las plantas supervivientes se arrancaron de raíz, se lavaron con agua del grifo para eliminar las partículas de suelo y se mantuvieron sumergidas en agua hasta la observación. Después de pesar cinco muestras de plantas, estas fueron almacenadas a -20°C en el refrigerador hasta que se prosiguió el análisis. Posteriormente estas muestras se utilizaron para estimar el potencial osmótico de la savia celular de las hojas con un Osmómetro de presión de vapor siguiendo el método de Capell y Dörffling (1993) usando la siguiente formula:

Potencial osmótico= Osmolalidad (mosmol)  $\times 0,831 \times 10^{-5} \times T$  (K).

El contenido de hídrico relativo (RWC) de ambas hojas de guisantes, las de control e infectadas (Hojas de cinco plantas por cada tratamiento) fueron calculadas de acuerdo al método de Weatherley (1950).

$RWC = [(masa\ fresca - masa\ seca) / (masa\ saturada - masa\ seca)] \times 100$

El contenido de azúcares de las hojas de cinco plantas tanto de control como experimentales se determinó siguiendo el método de Dubois *et al.* (1956). El contenido de prolina de las muestras de hojas se determinó siguiendo el método de Bates *et al.* (1973). El contenido de proteínas de las hojas se determinó siguiendo el método de Lowry *et al.* (1951).

also showed significant reduction in seedling vigor index (figure 2). Because fungus produces fungal metabolites which ultimately degrade the quality of the seeds and decrease their viability either by damaging cell membrane, by synthesizing cell wall degrading enzymes or by diminishing seedling amylase function (Shirurkar and Wahegaonkar, 2012; Khan *et al.*, 2017). *A. alternata* produces AAL-toxin which is a low molecular weight toxin and thought to be involved in the pathogenicity of *Alternaria* species in their selective host (Tsuge *et al.*, 2013; Taj *et al.*, 2015). Furthermore, biotic stresses significantly inhibit the growth of seeds and decreased germination rate, germination percentage and seedling vigour index (Perelló *et al.*, 2013). *Alternaria* blight also affects the other members of Fabaceae family as Sharma *et al.* (2013) reported that pigeon pea plants were severely damage by infection caused by *Alternaria alternata*.

Root and shoot lengths in fungus inoculated seeds of Leina and Meature was significantly reduced as compared to control (figure 3). Similar results were reported by Pangrikar *et al.* (2009) that the culture filtrates of three species of *Aspergillus* caused reduction in root and shoot length of cereals and pulses seed samples. Gachande and Jadhav (2011) also stated that root-shoot length of seedlings of pigeon pea varieties significantly suppressed by the metabolites of rhizospheric fungi of pigeon pea.

Biotic stress of *A. alternata* significantly reduced the fresh

Para estimar el contenido de clorofila y de carotenoides fue utilizado el método de Hiscox y Israelstam (1979). La clorofila a, b y el total de clorofila se calculó utilizando la fórmula de Arnon's (1949). El contenido de carotenoides se determinó de acuerdo al método de Lichtenthaler y Wellburn (1983). Los datos del estudio se procesaron mediante ANOVA y la Prueba de rango múltiple de Duncan (DMRT) se utilizó para comparar los valores medios.

## Resultados y discusión

Los efectos de *A. alternata* sobre los parámetros de germinación y la fisiología del guisante son presentados a continuación.

Un porcentaje de germinación y una tasa de germinación significativamente más bajos en las semillas tratadas con *A. alternata* fue observado en ambas variedades Leina y Meature en comparación al control (figura 1A y B). Las hojas infectadas de las variedades de guisantes 'Leina' y 'Meature' mostraron una significativa reducción en el índice de vigor de la plántula (figura 2). Se ha determinado que el hongo produce metabolitos, los cuales finalmente degradan la calidad de las semillas y disminuyen su viabilidad ya sea dañando la membrana celular, sintetizando enzimas que degradan la pared celular o disminuyendo la función amilasa de las plántulas (Shirurkar y Wahegaonkar, 2012; Khan *et al.*, 2017). *A. alternata* produce oxitocina AAL, la cual es una toxina de bajo peso molecular y se cree que está

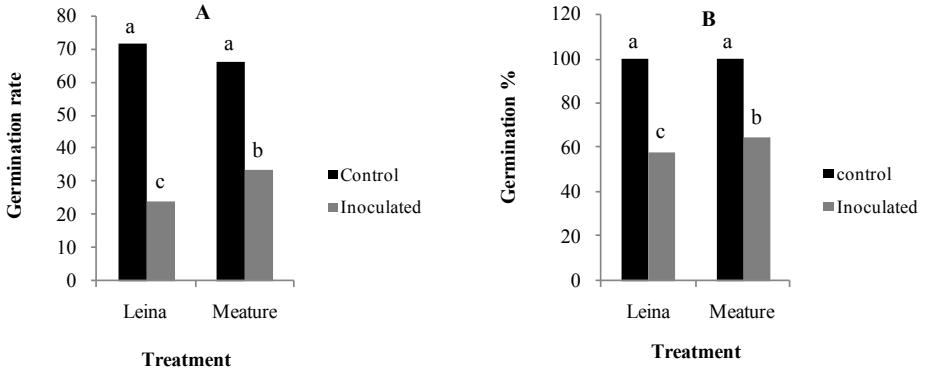


Figure 1A & B. Effect of *Alternaria alternata* on germination percentage and rate of germination of Liena and Meature varieties of pea. Values with different letters show significant difference ( $p \leq 0.05$ ) as determined by DMRT test.

Figura 1A y B. Efecto de *Alternaria alternata* sobre el porcentaje de germinación y tasa de germinación de las variedades de guisantes Leina y Meature. Los valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) según lo determinado por el test DMRT.

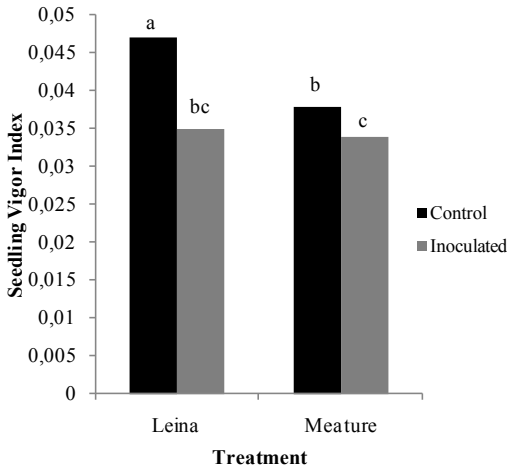


Figure 2. Effect of *Alternaria alternata* on seedling vigor index of Liena and Meature varieties of pea. Values with different letters show significant difference ( $p \leq 0.05$ ) as determined by DMRT test.

Figura 2. Efecto de *Alternaria alternata* en el índice de vigor de plántulas de las variedades de guisantes Leina y Meature. Valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) según lo determinado por el test DMRT

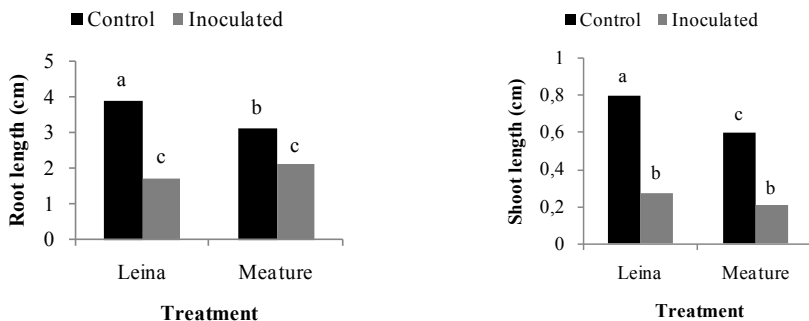


Figure 3. Effect of *Alternaria alternata* on root length and shoot length (cm) of Liena and Meature varieties of pea. Values with different letters show significant difference ( $p \leq 0.05$ ) as determined by DMRT test.

Figura 3. Efecto de *Alternaria alternata* sobre la longitud (cm) de la raíz y de los brotes de las variedades de guisantes Leina y Meature. Valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) según lo determinado por el test DMRT.

and dry weight of seedling of both varieties 'Leina' and 'Meature' in comparison to control (figure 4). So, it could be considered that pathogenic fungi produce various toxin which disturb the plant normal physiology by enhancing nutrients leakage from the damaged tissues (Noelting *et al.*, 2016) which finally result in poor growth and overall reduction in plant biomass (Houssien *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2012).

Significantly lower relative water content of leaves in both fungal treated plant varieties was observed compared to control (figure 5). Biotic stresses affect the water content of leaves, because it works during photosynthesis and help in transport of assimilates to other parts of plant body. The decline in leaf relative water content could be due to either

involucrada en la patogenicidad de las especies de *Alternaria* en su huésped selectivo (Tsuge *et al.*, 2013; Taj *et al.*, 2015). Además, el estrés biótico inhibe significativamente el crecimiento de las semillas y disminuye la tasa de germinación, el porcentaje de germinación y el índice de vigor de plántulas (Perelló *et al.*, 2013). El tizón de *Alternaria* también afecta a los otros miembros de la familia Fabaceae como Sharma *et al.* (2013) informó que las plantas de *Cajanus cajan* fueron severamente dañadas por la infección causada por *Alternaria alternata*.

La longitud de raíz y brote en semillas de Leina y Meature inoculadas con hongos se redujeron significativamente en comparación al control (figura 3). Resultados similares se reportaron por Pangrikar *et al.* (2009) donde los filtrados de cultivo de tres especies de *Aspergillus*

raised respiration rates or due to membrane injury and development of necrotic areas by the pathogenic fungi (Orcutt and Nilsen, 2000).

Osmotic potential in both tested varieties inoculated with fungus

causaron una reducción en la longitud de las raíces y brotes de muestras de semillas de cereales y legumbres. Gachande y Jadhav (2011) también afirmaron que la longitud de los brotes y de la raíz de las plántulas de

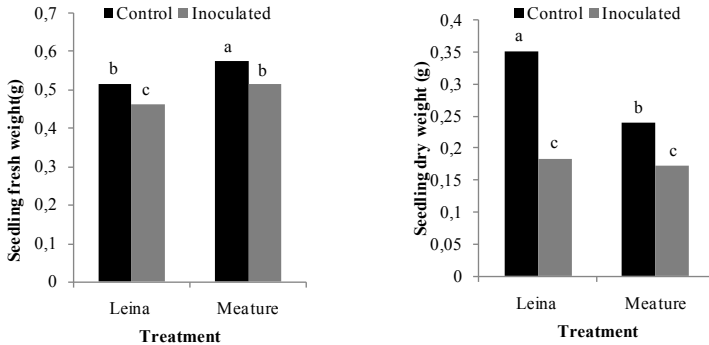


Figure 4. Effect of *Alternaria alternata* on seedling fresh and dry weight of Liena and Meature varieties of pea. Values with different letters show significant difference ( $p \leq 0.05$ ) as determined by DMRT test.

Figura 4. Efecto de *Alternaria alternata* sobre el peso fresco y seco de las plántulas de las variedades de guisantes Leina y Meature. Valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) según lo determinado por el test DMRT.

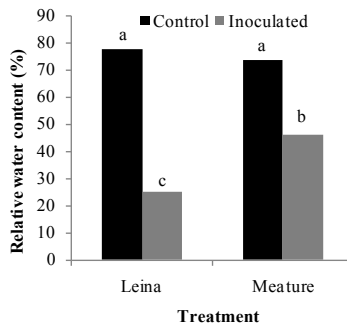


Figure 5. Effect of *Alternaria alternata* on leaf relative water content (%) of Liena and Meature varieties of pea. Values with different letters show significant difference ( $p \leq 0.05$ ) as determined by DMRT test.

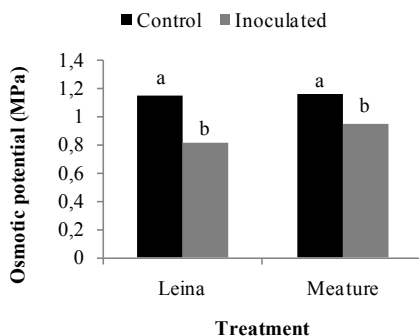
Figura 5. Efecto de *Alternaria alternata* sobre el contenido relativo de agua de la hoja (%) de las variedades de guisantes Leina y Meature. Valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) según lo determinado por el test DMRT.

were significantly low as compared to control plants (figure 6). The lower osmotic potential in infected leaves might be due to proline and other osmolytes accumulation in the leaves under stress which ultimately decreased osmotic potential.

Minimum chlorophyll a, b, total chlorophyll and carotenoid content

las variedades de *Cajanus cajan* se suprimió significativamente por los metabolitos de los hongos rizosféricos del guandú.

El estrés biótico de *A. alternata* redujo significativamente el peso fresco y seco de las plántulas de ambas variedades “Leina” y “Meature” en comparación con el control (figura 4). Por lo tanto, se



**Figure 6. Effect of *Alternaria alternata* on leaf osmotic potential (-MPa) of Liena and Meature varieties of pea.** Values with different letters show significant difference ( $p \leq 0.05$ ) as determined by DMRT test.

**Figure 6. Efecto de *Alternaria alternata* sobre el potencial osmótico de la hoja (-MPa) de las variedades de guisantes Leina y Meature.** Valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) según lo determinado por el test DMRT

were observed in both the tested pea varieties ‘Meature’ and ‘Leina’ over control (figure 7). Shirurkar and Wahegaonkar (2012) suggested that different toxin produced by fungi in plants disrupts synthesis of chlorophyll by inhibiting grana formation which leads to discoloration in the diseased plants. Biotic stress also caused destruction of carotenoids and chlorophyll contents (Scharte *et al.*, 2005).

podría considerar que los hongos patógenos producen varias toxinas que alteran la fisiología normal de la planta al propiciar la fuga de nutrientes de los tejidos dañados (Noelting *et al.*, 2016) que finalmente resultan en un crecimiento deficiente y una reducción general de la biomasa vegetal (Houssien *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2012).

Se observó un contenido relativo de agua significativamente menor

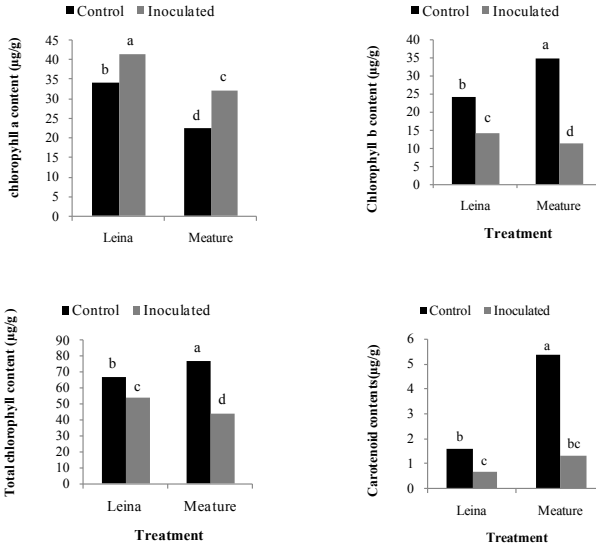


Figure 7. Effect of *Alternaria alternata* on leaf chlorophyll a,b, total chlorophyll and carotenoid content (µg.g<sup>-1</sup>) of Liena and Meature varieties of pea. Values with different letters show significant difference (p<0.05) as determined by DMRT test.

Figura 7. Efecto de *Alternaria alternata* sobre la clorofila a y b, contenido total clorofila y contenido de carotenoides en las hojas (µg.g<sup>-1</sup>) de las variedades de guisante Leina y Meature. Valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa (p<0,05) según lo determinado por el test DMRT.

Significantly high proline content was observed in fungus treated plant varieties Leina and Meature in comparison to control treatment (figure 8). In the leaves of fungus inoculated variety ‘Leina’ maximum proline content (mg.g<sup>-1</sup>) was found as compare to variety ‘Meature’. Proline is stress signaling compound and free proline contents increased in stressed plants in comparison with the healthy plants because proline involves in reactive oxygen species scavenging, in cytosolic acidity regulation and in osmotic adjustment (Arie *et al.*, 2007). Proline accumulation in higher

en las hojas de ambas variedades de plantas tratadas con hongos en comparación con el control (figura 5). El estrés biótico afecta el contenido de agua de las hojas, porque actúa durante la fotosíntesis y ayuda al transporte de asimilados a otras partes de la planta. La disminución en el contenido relativo de agua de las hojas podría deberse al aumento de las tasas de respiración o al daño de la membrana y al desarrollo de áreas necróticas por los hongos patógenos (Orcutt y Nilsen, 2000).

El potencial osmótico en ambas variedades probadas inoculadas con

vascular plants is a significant stress response against biotic stress agents such as pathogens (Claussen, 2005).

hongos fue significativamente bajo en comparación a las plantas control (figura 6). El potencial osmótico

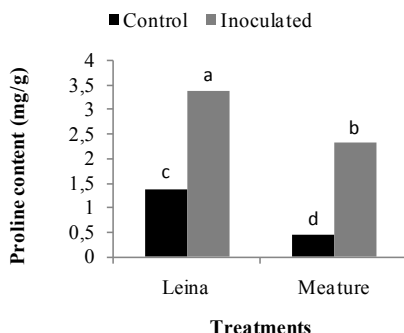


Figure 8. Effect of *Alternaria alternata* on leaf proline content ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) of Liena and Meature varieties of pea. Values with different letters show significant difference ( $p \leq 0.05$ ) as determined by DMRT test.

Figura 8. Efecto de *Alternaria alternata* sobre el contenido de prolina en las hojas ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) de las variedades de guisantes Leina y Meature. Valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) según lo determinado por el test DMRT-

Significant increase in protein content was observed in variety Leina fungus treated plants over control plants (figure 9). In variety 'Meature' protein content also enhanced in fungus treated plants as compare to control. Several studies reported that plants produced a class of proteins, known as pathogenesis-related (PR) proteins against microbial invaders (Wang *et al.*, 2010). PR proteins are known to be expressed in response to various external stimuli, including a variety of abiotic and biotic stress factors (El-Khallal, 2007).

The infected plants of both varieties 'Leina' and 'Meature' showed significantly lower leaf sugar content in comparison to control (figure 10). In varietal comparison

más bajo en hojas infectadas podría deberse a la acumulación de prolina y otros osmolitos en las hojas bajo estrés, que finalmente ocasionaron su disminución.

El contenido mínimo de clorofila a y b, total de clorofila y carotenoides fue observado en ambas variedades evaluadas de guisantes 'Meature' y 'Leina' en comparación con el control (figura 7). Shirurkar y Wahegaonkar (2012) sugirieron que toxinas diferentes producidas por hongos en las plantas interrumpen la síntesis de clorofila inhibiendo la formación de grana dentro de los cloroplastos, ocasionando la descoloración en plantas enfermas. El estrés biótico también causa la destrucción de los contenidos de carotenoides y de



significantly lowest sugar content was found in leaves of fungus treated plant in variety 'Leina'. This decrease in sugar content under *A. alternata* might be due to the destructive effect of the causal organism and its mycotoxins on the sugar content (Alqarawi *et al.*, 2013).

clorofila (Scharte *et al.*, 2005).

Un alto contenido significativo de prolina fue observado en las variedades Leina y Meature tratadas con hongos, en comparación al tratamiento de control (figura 8). En las hojas de la variedad 'Leina' inoculadas con el hongo se encontró el máximo contenido

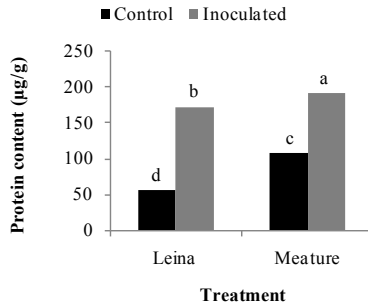


Figure 9. Effect of *Alternaria alternata* on leaf protein ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) of Liena and Meature varieties of pea. Values with different letters show significant difference ( $p\leq 0.05$ ) as determined by DMRT test.

Figura 9. Efecto de *Alternaria alternata* sobre la proteína de las hojas ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de las variedades de guisantes Leina y Meature. Valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa ( $p\leq 0,05$ ) según lo determinado por el test DMRT.

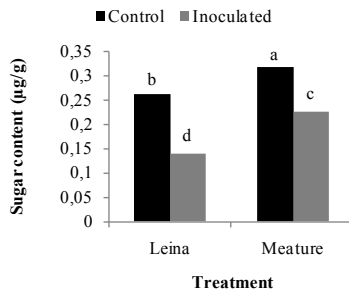


Figure 10. Effect of *Alternaria alternata* on leaf sugar ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) of Liena and Meature varieties of pea. Values with different letters show significant difference ( $P\leq 0.05$ ) as determined by DMRT test.

Figura 10. Efecto de *Alternaria alternata* sobre el azúcar de la hoja ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de las variedades de guisantes Liena y Meature. Valores con diferentes letras muestran una diferencia significativa ( $p\leq 0,05$ ) según lo determinado por el test DMRT.

## Conclusion

The current study can be concluded that *Alternaria alternata* is responsible for decline in germination, physiological and biochemical parameters in both Leina and Meature varieties.

---

### *End of English version*

---

de prolina ( $\text{mg g}^{-1}$ ) en comparación con la variedad "Meature". La prolina es un compuesto indicativo de estrés y el contenido de prolina libre aumentó en plantas estresadas, en comparación con las plantas sanas ya que la prolina participa en la eliminación de especies reactivas de oxígeno, en la regulación de la acidez citosólica y en el ajuste osmótico (Arie *et al.*, 2007). La acumulación de prolina en plantas vasculares superiores es una respuesta significativa de estrés contra agentes de estrés biótico como los patógenos (Claussen, 2005).

Un aumento significativo en el contenido de proteína fue observado en la variedad de guisante Leina tratada con el hongo, en comparación a las plantas de control (figura 9). En la variedad 'Meature' el contenido de proteína también aumentó en plantas tratadas con el hongo en comparación a las de control. Varios estudios reportaron que las plantas producen una clase de proteínas, conocidas como proteínas relacionadas con la patogenia (PR) contra invasores microbianos (Wang *et al.*, 2010). Las proteínas PR son conocidas por estar expresadas en la respuesta a varios

estímulos externos, que incluyen una variedad de factores de estrés abiótico y biótico (El-Khallal, 2007).

Las variedades de 'Leina' y 'Meature' infectadas mostraron contenido de azúcar de la hoja significativamente menor en comparación con el control (figura 10). En la comparación varietal, se encontró un contenido de azúcar significativamente más bajo en las hojas de la variedad Leina tratada con hongos. Esta disminución en el contenido de azúcar bajo *A. alternata* podría deberse al efecto destructivo del organismo causal y sus micotoxinas sobre el contenido de azúcar (Alqarawi *et al.*, 2013).

## Conclusión

Se puede concluir en el presente estudio que *Alternaria alternata* es responsable de disminuir la germinación, y los parámetros fisiológicos y bioquímicos en ambas variedades de guisantes Leina y Meature.

## Literature cited

- Abdul-Baki, A.A. and J.D. Anderson. 1973. Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop. Sci.* 13(6):630-633.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. Fifth edition, Academic Press. New York. 978 0120445646N. 633 p.
- Alqarawi, A.A., A. Hashem and E.F. Abd-Allah. 2013. Physiological alterations in *Avicennia marina* (Forski) Vierh. associated with leaf spot disease caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. *Pak. J. Bot.* 45(5):1767-1771.
- Aneja, J.K. and A. Agnihotri. 2013. *Alternaria* blight of oilseed brassicas:

- epidemiology and disease control strategies with special reference to use of biotechnological approaches for attaining host resistance. *Journal Oilseed Brassica* 4:1-10.
- Arie, T., H. Takahashi, M. Kodama and T. Teraoka. 2007. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant. Biotechnol.* 24(1):135-147.
- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant. Physiol.* 24(1):1-15.
- Bates, L.S., R.P. Waldren and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant. Soil.* 39(1):205-207.
- Capell, B. and K. Dörffling. 1993. Genotype specific differences in chilling tolerance of maize in relation to chilling induced changes in water status and abscisic acid accumulation. *Physiol. Plant.* 88(4):638-646.
- Claussen, W. 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant. Sci.* 168(1):241-248.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.T. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28(3):350-356.
- El-Khallal, S.M. 2007. Induction and modulation of resistance in tomato plants against *Fusarium* wilt disease by bioagent fungi (arbuscular mycorrhiza) and/or hormonal elicitors (jasmonic acid and salicylic acid): 2-changes in the antioxidant enzymes, phenolic compounds and pathogen related-proteins. *Aust. J. Basic. Appl. Sci.* 1(4):717-732.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations 2018. Faostat. Retrieved of <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Fondevilla, S., C. M. Avila, J. I. Cubero, and D. Rubiales. 2005. Response to *Mycosphaerella pinodes* in a germplasm collection of *Pisum* spp. *Plant Breeding*, 124: 313-315
- Gachande, B.D. and V.A. Jadhav. 2010. Effect of culture filtrates on seed germination and seedling growth of gram (*Cicer arietinum* L.). *BIOINFOLET-A Quarterly Journal of Life Sci.* 7(2): 173-174.
- Hadi, H. W. 2019. Secondary metabolites importance in *Alternaria alternata* fungus. *Pak. J. Biotechnol.* 16(4):237-244.
- Hadizadeh, I., B. Peivastegan and M. Kolahi. 2009. Antifungal activity of nettle (*Urtica dioica* L.), colocynth (*Citrullus colocynthis* L. Schrad), oleander (*Nerium oleander* L.) and konar (*Ziziphus spina-christi* L.) extracts on plants pathogenic fungi. *Pak. J. Biol. Sci.* 12(1):58-63.
- Hiscox, J.T. and G.F. Israelstam. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57(12):1332-1334.
- Houssien, A.A., S.M. Ahmed and A.A. Ismail. 2010. Activation of tomato plant defense response against *Fusarium* wilt disease using *Trichoderma harzianum* and salicylic acid under greenhouse conditions. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 6(3):328-338.
- Khan, A., I.A. Nasir, B. Tabassum, K. Aaliya, M. Tariq, A.Q. Rao. 2017. Expression studies of chitinase gene intragenic potato against *Alternaria solani*. *Plant. Cell. Tissue. Organ. Cult.* 128:563-576.
- Lichtenthaler, H.K. and A.R. Wellburn. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11:591-592.
- Lin, Q., H. Su and H. He. 2014. First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on *Bruguiera gymnorhiza* in China. *Plant Dis.* 99:286.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1):265-275.
- Maia, G.C.M., C.O. Goshi, J.F. Vieira, R.O. Pierre, J.B. Maia, P.M.R. Júnior and M.S. de Abreu. 2012. Pigments, total soluble phenols and lignin levels




- of coffee seedlings inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides*. Coffee. Sci. 7:152-159.
- Meena, P.D., A. Rani, R. Meena, P. Sharma, R. Gupta and P. Chowdappa. 2012. Aggressiveness, diversity and distribution of *Alternaria brassicae* isolates infecting oilseed Brassica in India. Afr. J. Microbiol. 6:5249-5258.
- Mostafavi, K., H.S. Geive, M. Dadresan and M. Zarabi. 2011. Effects of drought stress on germination indices of corn hybrids (*Zea mays* L.). Int. J. Agri. Sci. 1(1):10-18.
- Noelting, M.S., M. Sisterna, M. Lovisolo, A. Molla-Kralj, G. Lori, M.C. Sandoval, M. Sulyok and M.C. Molina. 2016. Discoloured seeds of amaranth plant infected by *Alternaria alternata*: physiological, histopathological alterations and fungal secondary metabolites associated or registered. J. Plant. Protect. Res. 56(3):244-249.
- Orcutt, D.M. and E.T. Nilsen. 2000. Influence of plant phytopathogens on host physiology. The physiology of plants under stress. Soil and biotic factors. Wiley, USA p. 236-239.
- Pangrikar, P.P., D.P. Gadgile, A.D. Hatti and A.M. Chavan. 2009. Seed physiology of different crops under the influence of bt and non-bt cotton rhizospheric fungi culture filtrate. J. Phytol. 1(6):404-407.
- Perelló, A., M. Gruhlke and A.J. Slusarenko. 2013. Effect of garlic extract on seed germination, seedling health, and vigour of pathogen-infested wheat. J. Plant. Prot. Res. 53(4):317-323.
- Rodino, S., M. Butu, P. Petrache, A. Butu and C.P. Cornea. 2014. Antifungal activity of four plants against *Alternaria alternata*. Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies 18:60-65.
- Scharte, J., H. Schön and E. Weis. 2005. Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. Plant. Cell. Environ. 28(11):1421-1435.
- Sharma, M., G. Raju. and S. Pande. 2013. Occurrence of *Alternaria alternata* causing *Alternaria* blight in pigeonpea in India. Adv. Biosci. Biotechnol. 4(6): 702-705.
- Shirurkar, D.D. and N.K. Wahegaonkar. 2012. Effect of aflatoxin on germination and seedling growth. Arch. Appl. Sci. Res. 4(6):2441-2446.
- Tapwal, A., S. Garg, N. Gautam and R. Kuma. 2011. *In vitro* antifungal potency of plant extracts against five phytopathogens. Braz. Arch. Biol. Technol. 54(6):1093-1098.
- Taj, G., P.D. Meena, P. Giri, D. Pandey, A. Kumar and A. Kumar. 2015. Pathogenesis mechanisms employed by *Alternaria* species. Journal Oilseed Brassica 6(2):213-240.
- Tsuge, T., Y. Harimoto, K. Akimitsu, K. Ohtani, M. Kodama, Y. Akagi, M. Egusa, M. Yamamoto and H. Otani. 2013. Host-Selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. FEMS Microbiol. Rev. 37: 44-66.
- Wang, J., Y. Jiang, S. Chen, X. Xia, K. Shi, Y. Zhou and J. Yu. 2010. The different responses of glutathione-dependent detoxification pathway to fungicide chlorothalonil and carbendazim in tomato leaves. Chemosphere 79(9):958-965.
- Weatherley, P. 1950. Studies in the water relations of the cotton plant. New Phytol. 49(1):81-97.
- Yang, W.X., F. Liu, N. Zhang, X.D. Ren and D.Q. Liu. 2013. First report of *A. alternata* causing blight on *Zanthoxylum piperitum* in China. Plant. Dis. 97:840.
- Younas, A., K. Jabeen, S. Iqbal and S. Javed. 2016. Effect of *Macrophomina phaseolina* on germination, growth and physiology of *Capsicum frutescens* L. Pak. J. Phytopathol 28(02):207-211.

## Critical indexes of compositional nutrient diagnosis (CND) and its validation in wheat fields

Índices críticos de diagnóstico de nutrientes compositionales (CND) y su validación en campos de trigo

Índices críticos de diagnóstico composicional de nutrientes (CND) e sua validação em campos de trigo

Abolfazl Geiklooi<sup>1</sup>, Adel Reyhanitabar<sup>2\*</sup> and Nosratollah Najafi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Former Ph.D student of Soil Science Department, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Email address: [abolfazl.geikloo@gmail.com](mailto:abolfazl.geikloo@gmail.com), . Professor of Soil Science Department, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail address: [areyhani@tabrizu.ac.ir](mailto:areyhani@tabrizu.ac.ir) or [areyhanitabar@yahoo.com](mailto:areyhanitabar@yahoo.com), . <sup>3</sup>Professor of Soil Science Department, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Email address: [nanajafi@yahoo.com](mailto:nanajafi@yahoo.com), .

### Abstract

Plant nutrient composition can be used as an evaluation criterion for optimum plant growth. The objectives of present study were to (a) derive critical compositional nutrient (CND) norms for survived wheat fields and sufficiency ranges as CND nutrient index for validation samples, (b) provide a squared CND threshold nutrient imbalance index (CND  $r^2$ ) and compare with DRIS nutrient imbalance indices, (c) determine balanced nutrients concentration with CND indices. The yield cutoff value was 4,232 kg.ha<sup>-1</sup>. The CND indexes results indicate that Zn is the most deficient nutrient in wheat, followed by Cu, Fe, Mn and B, whereas N is the most excessive nutrient, followed by K, Ca, Mg and P. In the validation trials, the yield cutoff value were reported 5,023 kg.ha<sup>-1</sup>. The calculated CND  $r^2$  in the validation population was lower than that of the survey wheat fields, indicating a more balanced concentration of nutrients due to the application of fertilizer treatments. Significant principal component (PC) loadings were obtained after the varimax rotation. The first three PCs in high- and low-yielding subgroups and whole data set indicated 52.8, 54.6 and 48.8 % total variance, respectively.

Recibido el 23-08-2019 • Aceptado el 24-11-2020.

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [areyhani@tabrizu.ac.ir](mailto:areyhani@tabrizu.ac.ir)

This study revealed that the decline in the wheat yield was due to the nutrient imbalance associated with multi nutrient deficiency (Zn, Cu, Fe, Mn and B) and multi nutrient excess (N, K, Ca, Mg and P).

**Keywords:** compositional nutrient diagnosis (CND), diagnosis and recommendation integrated system (DRIS), nutrients composition, principal component analysis (PCA).

### Resumen

La composición de nutrientes de las plantas se puede usar como criterio de evaluación para crecimiento óptimo. Los objetivos del estudio fueron (a) derivar normas de nutrientes composicionales críticos (CND) para campos de trigo sobrevivientes y rangos de suficiencia como índice de nutrientes CND para muestras de validación, (b) proporcionar un índice de desequilibrio de nutrientes umbral CND (CND  $r^2$ ) y comparar con índices de desequilibrio de nutrientes DRIS, (c) determinar la concentración equilibrada de nutrientes con índices de CND. El valor de corte de rendimiento fue 4.232 kg.ha<sup>-1</sup>. Los resultados de los índices CND indicaron que el Zn es el nutriente más deficiente, seguido de Cu, Fe, Mn y B, mientras que N fue el nutriente más excesivo, seguido de K, Ca, Mg y P. En validación, el valor del rendimiento de corte fue 5.023 kg.ha<sup>-1</sup>. El CND  $r^2$  calculado en la población de validación fue menor que el de campos de trigo encuestados, lo que indicó una concentración más equilibrada de nutrientes debido a la aplicación de fertilizantes. Se obtuvieron cargas significativas del componente principal (CP) después de la rotación varimax. Los tres primeros CP en subgrupos de alto y bajo rendimiento y conjunto de datos completos indicaron 52,8; 54,6 y 48,8 % de varianza total, respectivamente. Este estudio reveló que la disminución en el rendimiento del trigo fue causada por el desequilibrio de nutrientes asociado con la deficiencia de multi nutrientes (Zn, Cu, Fe, Mn y B) y el exceso de múltiples nutrientes (N, K, Ca, Mg y P).

**Palabras clave:** diagnóstico de nutrientes composicionales (CND), sistema integrado de diagnóstico y recomendación (DRIS), composición de nutrientes, análisis de componentes principales (ACP).

### Resumo

A composição de nutrientes da planta pode ser usada como um critério de avaliação para o crescimento ideal da planta. Os objetivos do presente estudo foram (a) derivar normas de nutrientes de composição crítica (CND) para campos de trigo sobreviventes e faixas de suficiência como índice de nutrientes CND para amostras de validação, (b) fornecer um índice de desequilíbrio nutricional de limiar de CND ao quadrado (CND  $r^2$ ) e comparar com Os índices de desequilíbrio de nutrientes DRIS, (c) determinam a concentração de nutrientes equilibrada com os índices CND. O valor de corte de rendimento foi de 4.232 kg.ha<sup>-1</sup>. Os resultados

dos índices CND indican que Zn é o nutriente mais deficiente em trigo, seguido por Cu, Fe, Mn e B, enquanto N é o nutriente mais excessivo, seguido por K, Ca, Mg e P. Nos ensaios de validação, o rendimento o valor de corte foi de 5.023 kg.ha<sup>-1</sup>. O CND  $r^2$  calculado na população de validação foi inferior ao dos campos de trigo da pesquisa, indicando uma concentração mais equilibrada de nutrientes devido à aplicação de tratamentos de fertilizantes. Cargas significativas de componentes principais (PC) foram obtidas após a rotação varimax. Os três primeiros PCs em subgrupos de alto e baixo rendimento e conjunto de dados inteiro indicaram 52,8; 54,6 e 48,8% de variância total, respectivamente. Este estudo revelou que o declínio na produtividade do trigo foi devido ao desequilíbrio de nutrientes associado à deficiência de multi nutrientes (Zn, Cu, Fe, Mn e B) e ao excesso de multi nutrientes (N, K, Ca, Mg e P).

**Palavras-chave:** diagnóstico composicional de nutrientes (CND), sistema integrado de diagnóstico e recomendação (DRIS), composição de nutrientes, análise de componentes principais (PCA).

## Introduction

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the most important food crops in the world. The total wheat cultivated area in Iran is about 6.5 million hectares. Balanced nutrition in crop is an important factor in improving the quality and quantity of crops. Nutrient composition of plant is diagnosed directly by leaf analysis (Hallmark and Beverly, 1991). Since nutrients uptake and distribution are affected by their interactions in the plants, multi-nutrient detection methods such as diagnosis and recommendation integrated system (DRIS) (Beaufils, 1973.) and compositional nutrient diagnosis (CND) (Parent and Dafir, 1992) have been proposed to assess the nutrients status of plants. The CND method proffer solutions to the limitations of both CVA and DRIS and generated nutrient standards are comparable to those of the boundary-line approach (Ali, 2018).

## Introducción

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es uno de los cultivos más importantes en el mundo. El área total de trigo cultivada en Irán es de aproximadamente 6,5 millones de hectáreas. La nutrición balanceada en el cultivo es un factor importante en el mejoramiento de la calidad y cantidad de los cultivos. La composición de nutrientes de las plantas es diagnosticada directamente por el análisis de la hoja (Hallmark y Beverly, 1991). Dado que la absorción y distribución de nutrientes se ven afectadas por sus interacciones en las plantas, los métodos de detección de múltiples nutrientes como el sistema integrado de diagnóstico y recomendación (DRIS) (Beaufils, 1973) y el diagnóstico de nutrientes composicionales (CND) (Parent y Dafir, 1992) han sido propuestos para evaluar el estado nutricional de las plantas. El método de CND propone soluciones a la limitaciones tanto de



Njoroge *et al.* (2017) developed CND norms of the high yielding subpopulations of corn for two seasons of short rains (SR) and long rains (LR). Gott *et al.* (2016) determined nutritional restriction order by DRIS and CND methods respectively as follow:  $Zn > Fe > Mn = B > N > P > Cu > K > Ca > S > Mg$  and  $P = Zn > Fe > B > N > Mn > K = Cu > S > Ca > Mg$ . Dezordi *et al.* (2016) stated that the four diagnostic methods (Critical Level, Sufficiency Range, DRIS and CND) generated similar reference values of nutrients for the carrot crop (*Daucus carota* L.). The result of this study showed that Mn, Mg, K and Ca were respectively the most limiting nutrient for growing carrot. Yousef *et al.* (2013) reported that the effectiveness of yield-limiting nutrients application was  $Mg < K < Ca < Fe < Zn < P < N < S < B$  using CND method. PCA is used on row-centered log ratios and derived nutrient indices in CND method for describing the interaction between the nutrients (Parent *et al.*, 1994; Raghuptahi *et al.*, 2005).

Unfortunately, in the study region, because of application mostly two types of fertilizers (urea and triple superphosphate) there are nutrient imbalances. The composition of crop nutrition, especially wheat, has not been investigated in this area so far and there is no published research on this subject. A study was conducted in Sahl El-Tina, Egypt, to determine the composition of nutrient balance and norms in wheat crop using CND method (Ali *et al.*, 2016).

The objectives of present study were to (1) derive CND norms for

CVA como DRIS y los estándares de nutrientes generados son comparables a los del enfoque de línea límite (Ali, 2018).

Njoroge *et al.* (2017) desarrollaron normas, CND para subpoblaciones de maíz de alto rendimiento, para dos temporadas de precipitaciones cortas (SR) y precipitaciones largas (LR). Gott *et al.* (2016) determinaron el orden de restricción nutricional mediante los métodos de DRIS y CND respectivamente de la siguiente manera:  $Zn > Fe > Mn = B > N > P > Cu > K > Ca > S > Mg$  and  $P = Zn > Fe > B > N > Mn > K = Cu > S > Ca > Mg$ . Dezordi *et al.* (2016) determinaron que los cuatro métodos de diagnóstico (Nivel crítico, rango de suficiencia, DRIS Y CND) generaron valores de referencia similares de nutrientes para el cultivo de zanahoria (*Daucus carota* L.). El resultado de este estudio mostró que Mn, Mg, K y Ca fueron respectivamente los nutrientes limitantes para el crecimiento de la zanahoria. Yousef *et al.* (2013) establecieron que la efectividad de la aplicación de nutrientes que limitan el rendimiento fue  $Mg < K < Ca < Fe < Zn < P < N < S < B$  a través del uso del método CND. PCA es utilizado en proporciones logarítmicas centradas en filas e índices de nutrientes derivados en el método CND para describir la interacción entre los nutrientes (Parent *et al.*, 1994; Raghuptahi *et al.*, 2005).

Desafortunadamente, en el área de estudio, existe desequilibrio de nutrientes debido a la aplicación de principalmente dos tipos de fertilizantes (urea y superfosfato



wheat fields of studied region and sufficiency ranges as CND nutrient index for validation samples, (2) provide a squared CND threshold nutrient imbalance index (CND  $r^2$ ) and compare with DRIS nutrient imbalance indices, (3) determine balanced nutrients concentration with CND indices.

**Materials and methods**

**Data collection.** The fields under investigation belong to agro-industrial Moghan Company situated in Ardabil Province, Northwest of Iran (from 39°23' to 39°42' N and from 47°25' to 48°23' E). The soils in this region are mainly Aridisols and Entisols according to the US soil classification system (Soil Taxonomy) (Banaii, 2000).

Composite soil samples (top 30 cm) were collected from each of 96 wheat fields with Kalango and Soisson

triple). La composición de la nutrición de cultivos, específicamente del trigo, no ha sido investigada en esta área hasta ahora y no hay investigaciones publicadas sobre este tema. Un estudio se llevó a cabo en Sahl El-Tina, Egipto, para determinar la composición del balance de nutrientes y normas en el cultivo de trigo usando el método CND (Ali *et al.*, 2016).

Los objetivos del presente estudio fueron (1) derivar normas CND para campos de trigo de la región estudiada y rangos de suficiencia como índice de nutrientes CND para muestras de validación, (2) proporcionar un índice umbral de desequilibrio de nutrientes CND al cuadrado (CND $r^2$ ) y comparar con índices umbral de desequilibrio de nutrientes DRIS, (3) determinar la concentración equilibrada de nutrientes con Índices CND.

**Materiales y métodos**

**Recolección de Datos.** Los campos bajo investigación pertenecen

**Table 1. Soil properties at the experimental field.**

**Cuadro 1. Propiedades del suelo en campo experimental.**

	pH	EC	OC	CaCO <sub>3-eq</sub>	Total N	Ca†	Mg†	Na†
		(dS/m)				(g.kg <sup>-1</sup> )		
Min.	7.7	1.67	0.6	30	0.3	8.9	0.093	0.43
Max.	8.2	7.71	23.2	210	1.8	28.8	4.2	1.6
Mean±SD	7.3 ± 0.17	1.17 ± 0.46	9.8 ± 3.8	103.3 ± 40	0.9 ± 0.3	11.7 ± 2.1	1.9 ± 0.7	0.7 ± 0.2
	K‡	P‡	Cu‡	Mn‡	Fe‡	Zn‡	B‡	
	(mg kg <sup>-1</sup> )							
Min.	391	4.4	0.42	0.96	0.19	0.04	0.02	
Max.	1726	40	6.96	8.87	10.86	1.62	2.63	
Mean±SD	760 ± 226	17 ± 5.2	2.4 ± 1	5.25 ± 1.45	4.81 ± 2.15	0.52 ± 0.24	1.19 ± 0.6	

EC: Electrical Conductivity, OC: Organic carbon, CaCO<sub>3</sub>: Calcium carbonate, †: exchangeable ‡: available.

EC: Conductividad eléctrica, OC: carbono orgánico, CaCO<sub>3</sub>: carbonato de calcio, †: intercambiable ‡: disponible.

cultivars at the beginning of the growing season. Samples were taken randomly to determine some chemical properties and soil essential nutrients status (Page *et al.*, 1982). The obtained results are shown in table 1.

The bread wheat cultivars of Soissons and Kalango were cropped at selected fields. Flag leaf samples were collected randomly from 96 wheat fields at the stage of flag leaf emergence (GS-39) (Singh *et al.* 2005). After air-drying, the samples were dried in the oven at 70° C and ground. N, P, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu and B determined by appropriate laboratory methods (Bhargava and Raghupathi, 1993). The wheat grain yield for the selected fields was obtained from the agronomic bureau at the Moghan agro-industrial company.

#### **Validation the threshold nutrient imbalance index**

A field experiment was conducted at agro-industrial Moghan Company of Parsabad Moghan, Ardabil province, Iran, involving application of Zn, Fe, Mn, and Cu to bread wheat. Validation tests were performed in three separate areas due to the vastness of agro-industrial Moghan Company lands and altitude range from 32 to 150 meters above sea level. Three separate trials in randomized block design were laid out. The experiment was a  $2 \times 2 \times 2 \times 2$  factorial at 2 levels of Zn ( $Zn_0 - Zn_{0.3\%}$ ), Fe ( $Fe_0 - Fe_{0.3\%}$ ), Mn ( $Mn_0 - Mn_{0.1\%}$ ), Cu ( $Cu_0 - Cu_{0.1\%}$ ) with 3 replicates per treatment. Nutrients were applied through foliar spray at two stages of tillering and stem extension. With counting to three separate trials and four factors at two levels each

a la compañía agroindustrial Moghan, situada en la provincia Ardabil, Noroeste de Irán (De 39°23' a 39°42' N y de 47°25' a 48°23' E). Los suelos en esta región son principalmente aridisoles y entisoles según el sistema de clasificación de suelos de EE. UU. (Taxonomía de suelos) (Banaii, 2000).

Muestras compuestas de suelos (Por encima de 30 cm) fueron recolectadas por cada 96 campos de trigo con cultivares Kalango y Soisson al comienzo de la temporada de crecimiento. Se tomaron muestras al azar para determinar algunas propiedades químicas y el estado de los nutrientes esenciales del suelo (Page *et al.*, 1982). Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 1.

Los cultivares de trigo Soissons y Kalango fueron cosechados en campos seleccionados. Las muestras de la hoja bandera fueron recolectadas aleatoriamente de 96 campos de trigo en la etapa de emergencia de la hoja bandera (GS-39) (Singh *et al.* 2005). Después del secado al aire, las muestras fueron secadas en el horno a 70°C. N, P, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu y B se determinaron a través de métodos de laboratorios apropiados (Bhargava y Raghupathi, 1993). El rendimiento del grano de trigo para campos seleccionados se obtuvo en la oficina agronómica de la compañía Agroindustrial Morgan.

#### **Validación del índice umbral de desequilibrio de nutrientes**

El experimento de campo se llevó a cabo en la compañía agroindustrial Morgan de Parsabad Moghan, provincia de Ardabil, Irán, que involucró la aplicación de Zn, Fe,

in three replication giving 144 plots. Leaf samples were randomly collected from wheat plots at the stage of flag leaf emergence. The concentration of nutrients and yields were determined by the previous methods.

**Analytical approach**

Plant tissue composition forms a *d*-dimensional nutrient arrangement; i.e. simplex ( $S_d$ ) made up of *d* + 1 nutrient proportions including *d* nutrients, and a filling value ( $R_d$ ) defined as (Parent and Dafir, 1992):

$$S_d = [(N,P,K,\dots,R_d):N>0,P>0,\dots R_d>0,N+P+K+\dots+R_d=100] \quad (1)$$

Where 100 is the dry matter concentration (%); N, P, K . . . are nutrients proportions (%), and  $R_d$  is the filling value computed as:

$$R_d = 100-(N+P+K+\dots) \quad (2)$$

According to CND methodology proposed by Parent and Dafir (1992), row-centered log ratio calculated for raw nutrient concentration. Thereafter, the database is partitioned between two subgroups using the Cate-Nelson procedure, once the observations have been ranked in a decreasing yield order.

CND norms are computed using means and standard deviations corresponding to the row-centered log ratios  $V_x$  of *d* nutrients for high-yield specimens, The CND nutrient imbalance index of a diagnosed specimen is its CND  $r^2$  and is computed by:

$$r^2 = I^2_N + I^2_P + I^2_K + I^2_{Ca} + I^2_{Mg} + I^2_{Fe} + I^2_{Zn} + I^2_{Mn} + I^2_{Cu} + I^2_B + I^2_{Rd} \quad (3)$$

Because CND indices are independent, unit-normal variables, the CND  $r^2$  values must have a chi-square distribution function. CND

Mn, and Cu al pan de trigo. Los test de validación se desarrollaron en tres áreas separadas debido a la amplia extensión de las tierras de la Compañía agroindustrial Moghan, cuya altitud variaba de 32 a 150 metros sobre el nivel del mar. Se dispusieron tres ensayos separados en un diseño de bloques completamente al azar. El experimento fue un  $2 \times 2 \times 2$  factorial a dos niveles de Zn ( $Zn_0 - Zn_{0,3\%}$ ), Fe ( $Fe_0 - Fe_{0,3\%}$ ), Mn ( $Mn_0 - Mn_{0,1\%}$ ), Cu ( $Cu_0 - Cu_{0,1\%}$ ) con 3 réplicas por tratamiento. Se aplicaron nutrientes a través de spray foliar en dos etapas de macollamiento y extensión del tallo. Contando tres ensayos separados y cuatro factores en dos niveles, cada uno en tres repeticiones se originaron 114 parcelas. Las muestras de hojas fueron recolectadas aleatoriamente de parcelas de trigo en estado de emergencia de la hoja bandera. La concentración de nutrientes y campos fueron determinadas por los métodos anteriores.

**Enfoque analítico**

La composición del tejido de la planta forma una disposición de nutrientes *d*-dimensional; es decir, simplex ( $S_d$ ) compuesto por proporciones de nutrientes *d* + 1 que incluyen nutrientes *d*, y un valor de llenado ( $R_d$ ) definido como (Parent y Dafir, 1992):

$$S_d = [(N,P,K,\dots,R_d):N>0,P>0,\dots R_d>0,N+P+K+\dots+R_d=100] \quad (1)$$

Donde 100 es la concentración de materia seca (%); N, P, K . . . son proporciones de nutrientes (%), y  $R_d$  es el valor de llenado calculado como:

$$R_d = 100-(N+P+K+\dots) \quad (2)$$

De acuerdo a la metodología CND

indices the closer to zero thus the  $CND$   $r^2$  or chi-square values are the higher probability of obtaining a high yield.

DRIS indices were calculated according to Beaufils (1973). The measure of the total nutritional imbalance, the nutrient imbalance index (NII), was calculated using the absolute values of the indices generated for the sample (Beaufils, 1973):

$$NII = |I_N| + |I_P| + |I_K| + |I_{Ca}| + |I_{Mg}| + |I_{Fe}| + |I_{Cu}| + |I_{Mn}| + |I_B| + |I_{Zn}| \quad (4)$$

Principal component analysis was performed on  $CND$  indices for high- and low-yielding subgroups and whole data to explore the correlation structure between  $CND$  indicators and nutrient interactions. The PC loadings having values greater than the selection criteria (SC) were given significance. The selection criterion was calculated as follows: (Raghuptahi *et al.*, 2005)

$$SC = \frac{0.5}{(PC \text{ eigen value})^{0.5}} \quad (5)$$

Excel software (as a component in Microsoft Office software 2010) and Statistical Product and Service Solutions (SPSS 23.0 software) were used for the purposes of the computations and statistical analysis of data.

## Results and discussion

**The compositional nutrient diagnosis norms.** The eleven-dimensional ( $d+1$ ) wheat (*T. aestivum* L.) simplex comprised the 10 nutrients N, P, K, Ca, Mg, Zn, Cu, Mn, Fe and B, and the filling value  $R$ . Nutrients

propuesta por Parent y Dafir (1992), relación logarítmica centrada en filas calculada para la concentración de nutrientes crudos. A partir de entonces, la base de datos se divide entre dos subgrupos utilizando el procedimiento de Cate-Nelson, una vez que las observaciones se han clasificado en un orden de rendimiento decreciente.

Las normas  $CND$  se calcularon utilizando las medias y desviaciones estándar correspondientes a las relaciones logarítmicas centradas en filas  $V_X$  de los nutrientes  $d$  para especímenes de alto rendimiento, el índice de desequilibrio de nutrientes  $CND$  de un espécimen diagnosticado es su  $CND$   $r^2$  y se calcula mediante:

$$r^2 = I_N^2 + I_P^2 + I_K^2 + I_{Ca}^2 + I_{Mg}^2 + I_{Fe}^2 + I_{Zn}^2 + I_{Mn}^2 + I_{Cu}^2 + I_B^2 + I_{Rd}^2 \quad (3)$$

Debido a que los índices  $CND$  son variables normales unitarias independientes, los valores  $CND$   $r^2$  deben tener una función de distribución de chi-cuadrado. Con índices  $CND$  más cercanos a cero, los valores  $CND$   $r^2$  o chi-cuadrado son la mayor probabilidad de obtener un alto rendimiento.

Los índices DRIS fueron calculados de acuerdo a Beaufils (1973). La medida del desequilibrio nutricional total y del índice del desequilibrio de nutrientes (NII), se calculó utilizando los valores absolutos de los índices generados por la muestra (Beaufils, 1973):

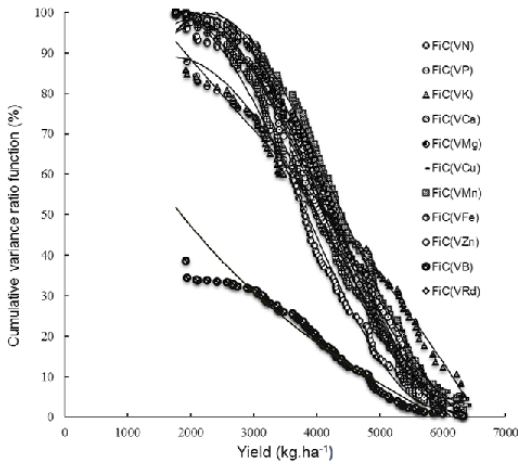
$$NII = |I_N| + |I_P| + |I_K| + |I_{Ca}| + |I_{Mg}| + |I_{Fe}| + |I_{Cu}| + |I_{Mn}| + |I_B| + |I_{Zn}| \quad (4)$$

El análisis de componentes principales (PC) se desarrolló en índices de  $CND$  para subgrupos

**Table 2. Wheat yield in inflection point of cumulative variance ratio functions.**

**Cuadro 2. Rendimiento del trigo en el punto de inflexión de las funciones de proporción de la varianza acumulada**

Nutrients		R <sup>2</sup>	Yield in inflection point (kg ha <sup>-1</sup> )
N	$y = 1.38x^3 - 17.845x^2 + 49.474x + 49.525$	0.991	4310
P	$y = 2.887x^3 - 35.453x^2 + 110.48x - 5.447$	0.995	4093
K	$y = -0.247x^3 + 2.306x^2 - 24.272x + 129.7$	0.991	3110
Ca	$y = 3.232x^3 - 39.84x^2 + 126.293x - 18.247$	0.995	4108
Mg	$y = 2.583x^3 - 29.58x^2 + 78.286x + 39.437$	0.993	3816
Cu	$y = 2.189x^3 - 27.67x^2 + 84.445x + 22.468$	0.997	4213
Mn	$y = 2.456x^3 - 32.608x^2 + 109.76x - 10.112$	0.997	4425
Fe	$y = 2.0664x^3 - 24.867x^2 + 67.224x + 47.084$	0.997	4008
Zn	$y = 2.069x^3 - 25.561x^2 + 72.475x + 42.337$	0.991	4116
B	$y = -0.1996x^3 + 3.6244x^2 - 30.531x + 95.32$	0.823	6052
Rd	$y = 2.7602x^3 - 35.593x^2 + 117.27x - 16.016$	0.997	4298



**Figure 1. The relationship between yield and the cumulative variance ratio function for 11 nutrients.**

**Figura 1. Relación entre el rendimiento y la función de proporción de varianza acumulada para 11 nutrientes.**

concentrations were transformed into CND row-centered log ratios and the cumulative variance ratio functions  $[FiC(V_x)]$  values calculated (table 2). The relationship between cumulative variance function and yield was cubic and the inflection point  $(-b/3a)$  is presented in figure 1.

Discrimination between the low and the high-yielding subgroups was made by mean of yield inflection points (4,232 kg.ha<sup>-1</sup>). This result implies that 44.8 % of the samples (43

de alto y bajo rendimiento y datos completos para explorar la estructura de correlación entre los indicadores de CND y las interacciones de nutrientes. Se les dio significancia a las cargas de PC que tenían valores superiores a los criterios de selección (SC). El criterio de selección se calculó de la siguiente manera: (Raghuptahi *et al.*, 2005)

$$SC = \frac{0,5}{(PC \text{ eigen value})^{0,5}} \quad (5)$$

**Table 3. Mean and standard deviation of wheat plant nutrients at high and low- yielding subgroup.**

**Cuadro 3. Desviación media y estándar para los nutrientes de la planta de trigo en el subgrupo de alto y bajo rendimiento.**

Parameter	High yield		Low yield	
	Mean	SD	Mean	SD
N (g.kg <sup>-1</sup> )	23.3	6.2	22.2	6.7
P (g.kg <sup>-1</sup> )	3.6	1.1	3.6	1.0
K (g.kg <sup>-1</sup> )	22.0	7.3	21.6	7.6
Ca (g.kg <sup>-1</sup> )	6.0	1.6	6.1	1.3
Mg (g.kg <sup>-1</sup> )	5.7	1.5	5.8	1.6
Cu (mg.kg <sup>-1</sup> )	6.18	2.5	7.3	3.4
Mn (mg.kg <sup>-1</sup> )	18.2	5.6	17.9	5.4
Fe (mg.kg <sup>-1</sup> )	81.2	38.1	77.1	37
Zn (mg.kg <sup>-1</sup> )	9.5	2.6	6.86	8.4*
B (mg.kg <sup>-1</sup> )	6.04	2.53	6.61	2.3
R <sub>d</sub>	93.92	0.94	94.06	1.06

\*: Significant difference at  $p < 0.05$

\*: Diferencia significativa a  $p < 0.05$

observations from 96) is considered as the high-yielding subgroup. The high yielding subgroup had significantly higher Zn ( $P < 0.05$ ) compared to the low-yielding subgroup. Average

Se utilizó Excel (como componente del software Microsoft Office 2010), Statistical Product y Service Solutions (software SPSS 23.0) para los cálculos y el análisis estadístico de los datos.

concentrations of other nutrients did not differ significantly ( $P \leq 0.05$ ) between the two subgroups (table 3).

The CND norms, as means and standard deviations of the CND row-centered log ratios for the high-yielding subgroup, are showed in table 4. These were used to estimate nutrients indices and  $CNDr^2$  values. According to the average concentration and norms of CND, nutrients concentrations in wheat samples with high yield were near the adequate nutrient range mentioned in the literature. There are differences between studies regarding nutrient concentration in the high-yielding subgroup and about the defined adequacy range of nutrient

## Resultados y discusión

### Normas para el diagnóstico de la composición nutricional

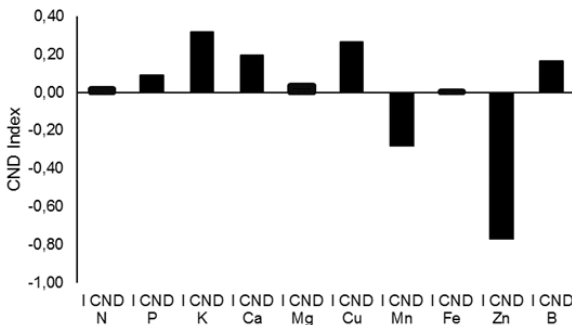
Las once dimensiones ( $d+1$ ) de trigo simple (*T. aestivum* L.) estaban compuestas por 10 nutrientes N, P, K, Ca, Mg, Zn, Cu, Mn, Fe y B, y el valor de llenado R. Las concentraciones de nutrientes se transformaron en relaciones logarítmicas centradas en filas de CND y se calcularon las funciones de relación de varianza acumulada [FiC(Vx)] (cuadro 2). La relación entre la función de varianza acumulada y el rendimiento fue cúbica y el punto de inflexión ( $-b / 3a$ ) se presenta en la figura 1.

**Table 4. CND norms of nutrients for wheat production with a yield cutoff value of 4,232 kg.ha<sup>-1</sup>.**

**Cuadro 4. Normas CND de nutrientes para la producción de trigo con un valor de rendimiento de corte de 4.232 kg.ha<sup>-1</sup>.**

	V <sub>N</sub> <sup>*</sup>	V <sub>P</sub> <sup>*</sup>	V <sub>K</sub> <sup>*</sup>	V <sub>Ca</sub> <sup>*</sup>	V <sub>Mg</sub> <sup>*</sup>	V <sub>Cu</sub> <sup>*</sup>	V <sub>Mn</sub> <sup>*</sup>	V <sub>Fe</sub> <sup>*</sup>	V <sub>Zn</sub> <sup>*</sup>	V <sub>B</sub> <sup>*</sup>	V <sub>Rd</sub> <sup>*</sup>	ΣVx
Mean	3.51	1.64	3.43	2.16	2.11	-4.76	-3.64	-4.65	-4.82	-2.25	7.25	0.00
SD	0.31	0.32	0.36	0.28	0.24	0.38	0.24	0.36	0.53	0.39	0.11	-

CND: Compositional Nutrient Diagnosis



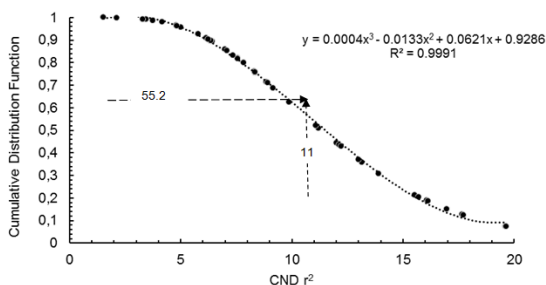
**Figure 2. Mean values of nutrient index for the flag leaf tissue.**

**Figura 2. Valores medios del índice de nutrientes para el tejido de la hoja bandera.**

concentrations. This is due to the difference in environmental conditions and the plant varieties (Quintanar *et al.*, 2006; Wairegi and Asten, 2011). The average of the nutrient indices in figure 2 shows that the nutritional requirements are as follows: Zn> Mn> Fe> N> Mg> P> B> Ca> Cu.

The survey showed that 55.2 % of observations relating to the yield, were following below 4,232 kg.ha<sup>-1</sup>. Chi-square or  $\chi^2$  value of the

La discriminación entre los subgrupos de alto y bajo rendimiento se realizó por la media de los puntos de inflexión del rendimiento (4.232 kg.ha<sup>-1</sup>). Este resultado implica que el 44,8 % de las muestras (43 observaciones de 96) sea considerado como un subgrupo de alto rendimiento. El subgrupo de alto rendimiento tuvo un Zn ( $P \leq 0,05$ ) significativamente más alto en comparación al subgrupo de bajo rendimiento. Las concentraciones



**Figure 3. Comparison between the chi-square cumulative function and the CND  $r^2$  distribution function to obtain the theoretical threshold CND  $r^2$  value (11.04) at yield cutoff in the survey population (n=96).**

**Figura 3. Comparación entre la función acumulada de chi-cuadrado y la función de distribución CND  $r^2$  para obtener el valor umbral teórico CND  $r^2$  (11,04) en el rendimiento de corte en la población evaluada (n = 96).**

corresponding theoretical low-yielding percent (55.2 %) with 12 degrees of freedom obtained 11.04 (figure 3). higher yield targets would increase the proportion of low-yield specimens in a population and produce narrower critical nutrient ranges (Khiari *et al.*, 2001c).

promedios de otros nutrientes no difirió significativamente ( $P \leq 0,05$ ) entre los dos subgrupos (cuadro 3).

Las normas de CND, como medias y desviaciones standard de las relaciones logarítmicas centradas en filas CND para el subgrupo de alto rendimiento se muestran en el cuadro 4. Estos



The DRIS norms, i.e. means and CVs of the selected nutrients ratios, for high-yielding subgroup are presented in table 5. The norms are used for nutrients imbalance indices (NII).

Linear regression correlating CND to DRIS is shown in figure 4. The  $r^2$  was 0.92 for relationships between CND and DRIS, for nutrient indices.

The linear regression with high  $r^2$  showed a close relationship between nutrient CND and DRIS indices. It can be stated that the CND and DRIS methods presented similar diagnosis of nutrients balances. The CND critical index (Ix) of each nutrient was calculated from samples belonging to the low-yielding subgroup that shows nutrients imbalance in this subgroup. The interpretation of compositional nutrient diagnosis methods is based on CND indices (Ix) which are the ratios of the distance of a nutrient from its geometric mean to the distance of the same nutrient from high-yielding subgroup geometric mean. The mentioned index depends not only on the nutrient level but also on the relative position of the low-yielding subgroup geometric mean compared to the high-yielding subgroup geometric mean. Critical indices compare the nutrient level and nutrient balance (Parent and Dafir, 1992). Studies show that the relationship between nutrient balance index and nutrient concentration in the low-yielding subgroup follows the logarithmic model. The crossing point of the logarithmic curve with the horizontal axis indicates the zero index that represents a balanced nutrient concentration (table 6). Nutrient

fueron usados para estimar los índices de nutrientes y los valores  $CNDr^2$ . De acuerdo al promedio de concentración y normas CND, las concentraciones de nutrientes en muestras de trigo con alto rendimiento fueron cercanas al intervalo adecuado de nutrientes mencionados en la literatura. Existen diferencias entre estudios con respecto a la concentración de nutrientes en el subgrupo de alto rendimiento y sobre el rango definido de adecuación de concentraciones de nutrientes. Esto es debido a la diferencia de condiciones ambientales y variedades de plantas (Quintanar *et al.*, 2006; Wairegi y Asten, 2011). El promedio de los índices de nutrientes en la figura 2, muestra que los requerimientos nutricionales son los siguientes:  $Zn > Mn > Fe > N > Mg > P > B > Ca > Cu$ .

La encuesta mostró que el 55,2% de las observaciones relacionadas con el rendimiento, seguían por debajo de  $4.232 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ . El valor de Chi-cuadrado o  $CND r^2$  del correspondiente porcentaje teórico de bajo rendimiento (55,2%) con 12 grados de libertad obtuvo 11,04 (figura 3). Los objetivos de mayor rendimiento aumentarían la proporción de especímenes de bajo rendimiento en una población, y producirían rangos de nutrientes críticos más estrechos (Khiari *et al.*, 2001c).

Las normas DRIS, las medias i.e. y CVs de las proporciones de nutrientes seleccionadas para el subgrupo de alto rendimiento son presentadas en el cuadro 5. Las normas son utilizadas para los índices de desequilibrio de nutrientes (NII).

Table 5. DRIS norms of nutrients dual ratio in high-yielding subgroup.

Cuadro 5. Normas DRIS de proporción dual de nutrientes en el subgrupo de alto rendimiento.

Ratio	Mean	CV	Ratio	Mean	CV
N/P	7.2	49.8	Ca/Mg	1.11	33.6
N/K	1.22	51.9	Cu/Ca	0.00111	49.7
Ca/N	0.27	34.3	Mn/Ca	0.00329	43.4
N/Mg	4.37	40.3	Ca/Fe	93.9	47.1
Cu/N	0.00029	54.8	Zn/Ca	0.00123	46.8
Mn/N	0.00086	46.8	B/Ca	0.00111	63.5
N/Fe	360.89	46.3	Ca/Rd	0.00642	26.7
Zn/N	0.00033	55.7	Cu/Mg	0.00118	56.5
B/N	0.00029	62.5	Mg/Mn	338.0	33.8
Rd/N	43.97	34.7	Fe/Mg	0.01447	57.9
P/K	0.19	61.4	Zn/Mg	0.00125	39.2
Ca/P	1.88	53.7	B/Mg	0.00110	46.5
Mg/P	1.77	47.8	Rd/Mg	175.7	28.5
Cu/P	0.00185	48.9	Cu/Mn	0.34656	35.7
Mn/P	0.00550	42.1	Cu/Fe	0.09348	46.1
P/Fe	56.1	48.3	Cu/Zn	1.08212	65.6
Zn/P	0.00207	46.4	B/Cu	1.14644	54.5
B/P	0.00184	53.7	Cu/Rd	6.58E-06	40.6
Rd/P	291.3	41.8	Fe/Mn	4.40174	46.1
Ca/K	0.310	45.6	Zn/Mn	0.39338	36.3
Mg/K	0.296	51.6	B/Mn	0.35867	48.7
Cu/K	0.00032	58.6	Mn/Rd	1.94E-05	30.8
Mn/K	0.00094	48.1	Zn/Fe	0.10133	45.7
Fe/K	0.00402	65.8	B/Fe	0.09552	58.5
Zn/K	0.00035	50.4	Rd/Fe	14413.1	34.9
B/K	0.00031	53.0	B/Zn	1.00980	55.1
Rd/K	49.0	45.9	Zn/Rd	7.31E-06	37.2
			B/Rd	6.43E-06	41.9

DRIS: Diagnostic and Recommendation Integrated System, Rd: filling value.

DRIS: Sistema integrado de diagnóstico y recomendación, Rd: valor de llenado.

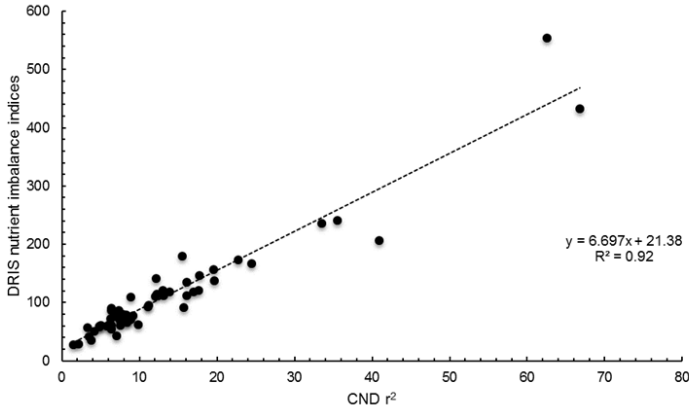


Figure 4. Relationship between nutrients imbalance indices (NII) of DRIS and CND  $r^2$ .

Figura 4. Relación entre los índices de desequilibrio de nutrientes (NII) de DRIS y CND  $r^2$ .

Table 6. The regression relationship between nutrient balance index and nutrient concentration in the low-yielding subgroup.

Cuadro 6. Relación de regresión entre el índice de equilibrio de nutrientes y la concentración de nutrientes en el subgrupo de bajo rendimiento.

Nutrient	Regression equation	$r^2$	Balanced nutrient concentration
Nitrogen	$CND I_N = 2.52\ln(x) - 2.16$	0.86	2.35
Phosphorus	$CND I_P = 3.83\ln(x) + 3.37$	0.90	0.41
Potassium	$CND I_K = 2.31\ln(x) - 1.60$	0.94	2.00
Calcium	$CND I_{Ca} = 2.99\ln(x) + 1.55$	0.79	0.59
Magnesium	$CND I_{Mg} = 4.58\ln(x) + 2.42$	0.86	0.59
Copper	$CND I_{Cu} = 2.25\ln(x) - 3.89$	0.93	5.61
Manganese	$CND I_{Mn} = 3.34\ln(x) - 9.72$	0.79	18.34
Iron	$CND I_{Fe} = 2.23\ln(x) - 9.43$	0.92	67.75
Zinc	$CND I_{Zn} = 2.04\ln(x) - 3.79$	0.96	6.43
Born	$CND I_B = 1.47\ln(x) - 2.48$	0.92	5.42

concentrations corresponding to the crossing point are indicated in table 3. This curve can represent the new

La correlación de la regresión lineal entre CND y DRIS se muestra en la figura 4. La  $r^2$  fue 0,92 para las

**Table 7. Wheat yield in inflection point of cumulative variance ratio functions at validation population.****Cuadro 7. Rendimiento de trigo en el punto de inflexión de las funciones de proporción de la varianza acumulada en la población de validación.**

Nutrients	$F_i(V_x) = aY^3 + bY^2 + cY + d$	$r^2$	Yield in inflection point (mg.kg <sup>-1</sup> )
N	$y = 1.3729x^3 - 21.989x^2 + 89.138x - 4.3401$	$r^2 = 0.99$	5339
P	$y = 1.4491x^3 - 18.933x^2 + 50.571x - 78.811$	$r^2 = 0.98$	4355
K	$y = 1.8032x^3 - 22.887x^2 + 60.647x + 78.357$	$r^2 = 0.97$	4231
Ca	$y = 1.7133x^3 - 27.805x^2 + 119.67x - 54.042$	$r^2 = 0.99$	5410
Mg	$y = 1.0845x^3 - 15.131x^2 + 42.123x + 76.085$	$r^2 = 0.99$	4651
Fe	$y = 0.5391x^3 - 9.457x^2 + 33.231x + 54.21$	$r^2 = 0.99$	5847
Zn	$y = -0.5713x^3 + 10.613x^2 - 74.717x + 202.29$	$r^2 = 0.99$	6192
Mn	$y = 0.6638x^3 - 9.3252x^2 + 18.635x + 104.59$	$r^2 = 0.99$	4683
Cu	$y = 1.6971x^3 - 23.169x^2 + 72.942x + 46.57$	$r^2 = 0.98$	4551
B	$y = 1.8987x^3 - 29.515x^2 + 121.04x - 46.931$	$r^2 = 0.99$	5182
Rd	$y = 2.2681x^3 - 32.753x^2 + 123.26x - 34.191$	$r^2 = 0.98$	4814

method for determination of the optimized concentration for maximum yield.

### Validate the threshold nutrient imbalance index

In the validation population, the mean yield cutoff value (5,023 mg.kg<sup>-1</sup>) used to divide the high- and low-yield groups was calculated by cumulative variance ratio functions (Khiari *et al.*, 2001a) (table 7).

Average concentrations of nutrients did not differ significantly between the two subgroups (table 8). This result showed that nutrients application in the validation trials caused to nutrients concentration closed to each other in the two subgroups, therefore nutrients composition were balanced.

Nutrient sufficiency ranges were obtained by the squared values of CND nutrient indexes ( $I_x$ ) (table 9). The

relaciones entre CND y DRIS para los índices de nutrientes.

La regresión lineal con  $r^2$  alto mostró una relación cercana entre los índices de nutrientes de CND y DRIS. Se puede decir que los métodos CND Y DRIS presentaron un diagnóstico similar a los balances de nutrientes. El índice crítico CND ( $I_x$ ) de cada nutriente fue calculado a partir de cada muestra correspondiente al subgrupo de bajo rendimiento, lo cual muestra el desequilibrio de nutrientes de este subgrupo. La interpretación de los métodos de diagnóstico de la composición de nutrientes está basada en los índices CND ( $I_x$ ) los cuales son las proporciones de la distancia de un nutriente desde su media geométrica a la distancia del mismo nutriente desde la media geométrica del subgrupo de alto rendimiento. El índice mencionado

CND<sub>r</sub><sup>2</sup> imbalance index is amenable to CND index ranges defined on a theoretical basis. Additive critical CND values mean that critical I<sub>x</sub> ranges between -I<sub>x</sub> and +I<sub>x</sub> could be obtained simply by computing the square root of. This method for nutrient balances contrasts with the DRIS concept that the more negative an index is, the more deficient the nutrient. CND would provide a simple

no depende solamente del nivel del nutriente sino también de la posición relativa de la media geométrica del subgrupo de bajo rendimiento en comparación a la media geométrica del subgrupo de alto rendimiento. Los índices críticos comparan el nivel de nutrientes y el equilibrio de nutrientes (Parent y Dafir, 1992). Estudios demuestran que la relación entre el índice de equilibrio de nutrientes y

**Table 8. Mean and standard deviation of wheat plant nutrients at high and low- yielding validation subgroup.**

**Cuadro 8. Desviación media y estándar de los nutrientes de las plantas de trigo en el subgrupo de validación de alto y bajo rendimiento.**

Parameter	High yield		Low yield	
	Mean	SD	Mean	SD
N (g.kg <sup>-1</sup> )	24.60	7.20	22.30	7.40
P (g.kg <sup>-1</sup> )	3.90	1.50	4.00	2.00
K (g.kg <sup>-1</sup> )	24.00	5.80	22.50	7.40
Ca (g.kg <sup>-1</sup> )	6.60	2.60	6.60	2.50
Mg (g.kg <sup>-1</sup> )	5.50	2.20	5.60	2.60
Cu (mg.kg <sup>-1</sup> )	12.65	4.88	12.28	4.14
Mn (mg.kg <sup>-1</sup> )	37.54	10.24	35.04	10.32
Fe (mg.kg <sup>-1</sup> )	120.84	60.38	124.84	47.95
Zn (mg.kg <sup>-1</sup> )	29.25	8.98	28.85	8.41
B (mg.kg <sup>-1</sup> )	8.97	1.91	8.52	1.97
R <sub>d</sub>	93.51	0.81	93.88	1.16

and cost-effective tool for diagnosing nutrient imbalance in a large number of specific soil-plant systems with small databases (Khiari *et al.*, 2001b).

In validation population 104 of the 144 specimens, or 72 % of the population, was below yield cutoff of 5,023 kg.ha<sup>-1</sup>. The corresponding chi-square or CND<sub>r</sub><sup>2</sup> value was 9.08

la concentración de nutrientes en subgrupos de bajo rendimiento sigue el modelo logarítmico. El punto de cruce de la curva logarítmica con el eje horizontal indica el índice cero que representa una concentración equilibrada de nutrientes (cuadro 6). Las concentraciones de nutrientes correspondientes al punto de cruce

(figure 5). Given the reduction of the CND  $r^2$  value, it is determined that the nutrients with the fertilizer application trials have been more balanced. Theoretically, at the critical

se indican en el cuadro 3. Esta curva puede representar el nuevo método para la determinación de la concentración optimizada para un rendimiento máximo.

**Table 9. Critical squared compositional nutrient diagnosis (CND) indexes and sufficiency ranges in the validation samples.**

**Cuadro 9. Índices de diagnóstico de composición de nutrientes (CND) al cuadrado crítico y rangos de suficiencia en las muestras de validación.**

CND index	Critical value of CND $r^2$	Critical ranges	
		Upper limit	Lower limit
	0.95	0.98	-0.98
	0.62	0.79	-0.79
	0.69	0.83	-0.83
	0.71	0.84	-0.84
	0.98	0.99	-0.99
	0.75	0.86	-0.86
	0.86	0.93	-0.93
	0.81	0.90	-0.90
	0.87	0.93	-0.93
	1.03	1.02	-1.02
	0.82	0.91	-0.91
Sum CND $r^2$	9.08	9.97	

chi-square value of zero where the ideal nutrient balance is reached, 100 % of the population would be expected to produce below- cutoff yield by definition (Khiari *et al.*, 2001a).

#### Nutrient interactions

Principal component analysis (PCA) was conducted on CND indices related to the whole data set including high and low yielding subgroups. Significant factor loadings were obtained after the varimax rotation (Gutiérrez-Acosta *et al.*, 2002). The first three factors in high and low yielding subgroups in whole data

#### Validación del índice umbral del desequilibrio de nutrientes

En la población de validación, el valor de la media de rendimiento de corte (5,023 mg.kg<sup>-1</sup>) utilizada para dividir el alto y bajo rendimiento de los grupos fue calculado por funciones de proporción de varianza acumulada (Khiari *et al.*, 2001a) (cuadro 7).

Las concentraciones promedio de nutrientes no difirieron significativamente entre los dos subgrupos (cuadro 8). Este resultado mostró que la aplicación de nutrientes en los ensayos de validación, causó una

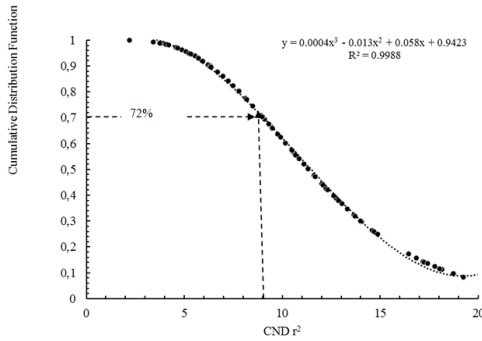


Figure 5. Application cumulative function to obtain the theoretical threshold CND  $r^2$  value (9.08) at yield cutoff in the validation population (n=144).

Figura 5. Aplicación de la función acumulada para obtener el valor umbral teórico CND  $r^2$  (9,08) en el rendimiento de corte en la población de validación (n = 144).

Table 10. Principal component analysis of nutrient concentration for CND indices.

Cuadro 10. Análisis de componentes principales de la concentración de nutrientes para índices CND.

Index	High yielding subgroup			Low yielding subgroup			Total population		
	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
$I_N$	-0.085	<b>0.785</b>	0.060	-0.046	<b>-0.700</b>	-0.261	-0.338	-0.117	<b>0.638</b>
$I_P$	<b>0.476</b>	-0.106	-0.272	0.001	<b>-0.577</b>	0.344	0.031	0.186	<b>0.490</b>
$I_K$	-0.297	0.079	0.075	0.079	0.001	<b>0.674</b>	0.045	<b>-0.597</b>	0.062
$I_{Ca}$	-0.318	<b>0.699</b>	0.065	<b>0.730</b>	-0.052	0.352	<b>-0.517</b>	<b>0.461</b>	0.189
$I_{Mg}$	<b>-0.544</b>	-0.068	-0.329	<b>-0.791</b>	0.056	0.052	<b>0.640</b>	0.232	-0.308
$I_{Cu}$	<b>0.817</b>	0.159	0.087	<b>-0.628</b>	0.343	0.224	<b>0.772</b>	0.160	0.035
$I_{Mn}$	<b>0.623</b>	-0.228	0.416	<b>-0.470</b>	<b>0.548</b>	-0.013	<b>0.675</b>	-0.116	-0.071
$I_{Fe}$	-0.136	-0.285	<b>0.751</b>	-0.123	0.032	<b>-0.747</b>	0.001	<b>-0.742</b>	0.026
$I_{Zn}$	-0.336	<b>-0.643</b>	0.229	<b>-0.617</b>	-0.179	-0.163	0.210	<b>-0.535</b>	-0.005
$I_B$	-0.139	-0.224	<b>-0.781</b>	<b>0.415</b>	<b>-0.548</b>	-0.364	-0.231	0.026	<b>-0.775</b>
Eigen value	2.103	1.738	1.437	2.456	1.634	1.376	2.183	1.430	1.269
% Variance	21.027	17.383	14.370	24.556	16.342	13.755	21.834	14.296	12.691
Selection criteria	0.345	0.379	0.417	0.319	0.391	0.426	0.338	0.418	0.444
	PC1=P+Cu+Mn+Mg-			PC1=Ca+ B+ Mg-Cu-Mn-Zn-			PC1=Mn+Cu+Ca-Mg+		
	PC2=N+Ca+Zn-			PC2=Mn+N.P-B-			PC2= Ca+ K.Fe-Zn-		
	PC3=Fe+B-			PC3=K+Fe-			PC3=N+P+B-		

explained 52.8, 54.6 of the total variance, respectively, and 48.8 % of the total variance of the total population (table 10).

The first principal component of the total data set showed a negative and positive correlation between nutrients that was designated as (Ca-Mg+Cu+Mn+). In the second PC nutrition interaction was defined as (Ca+K-Fe-Zn-) and in the third component change of nutrients was defined as (N+P+B-). The principal component analysis resulted in positive and negative correlations in the high yield subgroup indicating positive and negative interactions between nutrients. The correlations were presented in three PCs as follow: PC1 (P+Cu+Mn+Mg-), PC2 (N+Ca+Zn-) and PC3 (Fe+B-). Positive and negative nutrient correlations in the low-yielding subgroup were shown as follows: the PC1 (Ca+B+Mg-Cu-Zn-), PC2 (Mn+N-P-B-) and PC3 (K+F-). Investigation of the factor loadings resulting from the analysis of three sets of data showed that there were negative interactions between macronutrients and micronutrients.

It is well known that the optimum plant growth depends not only on the total amount of nutrients but also on their availability. Nutrients availability is controlling by physico-chemical properties soil such as texture classes, organic carbon, calcium carbonate, pH and electrical conductivity (Bell and Dell, 2008). The soils of studied region were characterized by low organic carbon content, high pH and salinity/alkalinity problems (table

concentración cerrada entre los dos subgrupos, por lo que la composición de nutrientes fue equilibrada.

Los rangos de suficiencia de nutrientes se obtuvieron mediante los valores al cuadrado de los índices de nutrientes CND (Ix) (cuadro 9). El índice de desequilibrio  $CNDr^2$  es susceptible a los rangos de índice CND definidos sobre una base teórica. Los valores críticos aditivos de significan que los rangos críticos de Ix entre -Ix y + Ix podrían obtenerse simplemente calculando la raíz cuadrada de . Este método para equilibrios de nutrientes contrasta con el concepto DRIS de que cuanto más negativo es un índice, más deficiente es el nutriente. La CND proporcionaría una herramienta simple y rentable para diagnosticar el desequilibrio de nutrientes en una gran cantidad de sistemas específicos suelo-planta con pequeñas bases de datos (Khiari *et al.*, 2001b).

En la población de validación 104 de 144 especímenes, o 72% de la población, estuvo bajo un rendimiento de corte de 5.023 kg.ha<sup>-1</sup>. El valor correspondiente al chi-cuadrado o  $CNDr^2$  fue 9,08 (figura 5). Dada la reducción del valor de  $CNDr^2$ , se determinó que los nutrientes con los ensayos de aplicación de fertilizantes han sido más equilibrados. Teóricamente, en el valor crítico de chi-cuadrado de cero donde se alcanza el equilibrio ideal de nutrientes, se esperaría que el 100% de la población produjera un rendimiento de corte por debajo del límite por definición (Khiari *et al.*, 2001a).

### Interacciones de nutrientes

El análisis de componentes principales (PCA) se llevó a cabo



1). These soil conditions are not favorable for adequate availability of micronutrients.

Application of N increases the uptake of P and Ca. Nitrogen increases the root hair, causes chemical changes in the rhizosphere and physiological changes in the plant. Such factors improve absorption of macronutrients (Baligar *et al.*, 2001). The interaction between N and micronutrients depends on pH changes in the rhizosphere. Nitrogen is absorbed as nitrate and increases the pH of the rhizosphere, and thus reduces the absorption of most micronutrients. Plants absorb K more efficiently than Fe. High K prevents Fe uptake and transport in plants, causing Fe deficiency. The researchers reported that the use of Fe as well as K in soil increases sorghum yield (Matocha and Thomas, 1969). Soils having low Zn concentration enhanced the B concentration in wheat (Singh *et al.*, 1990). High Ca concentration prevents Mg absorption. The decrease of Mg absorption occurs due to the competition between Ca and Mg for same absorption sites (Maas and Ogata, 1971). In wheat, Cu imposes positive effects on P uptake and significant negative effect on the absorption of Ca and Mg (Fageria, 2009). The researchers stated that there are antagonistic relationship between B and Zn, as well as between Fe and Mn (Zaharieva, 1986; Chinnery and Harding 1980 and Singh *et al.*, 1990). Interactions between B and P are not clear. Phosphorus may increase or decrease B uptake or have no effect on it. It has been found that the use of P prevents toxic accumulation of B

en los índices CND relacionados al conjunto de datos completo que incluye subgrupos de alto y bajo rendimiento. Se obtuvieron cargas factoriales significativas después de la rotación varimax (Gutiérrez-Acosta *et al.*, 2002). Los primeros tres factores en los subgrupos de alto y bajo rendimiento en los datos completos explicaron el 52,8, el 54,6 de la varianza total, respectivamente, y el 48, 8% de la varianza total de la población total (cuadro 10).

El componente principal del conjunto de datos totales mostró una correlación negativa y positiva entre los nutrientes que fueron designados como (Ca-Mg+Cu+Mn+). En el segundo PC la interacción nutricional fue definida como (Ca+K-Fe-Zn-) y en el tercer componente el cambio de nutrientes fue definida como (N+P+B). El análisis del componente principal resultó en correlaciones positivas y negativas en subgrupos de alto rendimiento indicando interacciones positivas y negativas entre nutrientes. Las correlaciones se presentaron en tres PCs de la siguiente manera: PC1 (P+Cu+Mn+Mg-), PC2 (N+Ca+Zn-) y PC3 (Fe+B-). Correlaciones de nutrientes positivas y negativas en subgrupos de bajo rendimiento se mostraron de la siguiente manera: El PC1 (Ca+B+Mg-Cu-Zn-), PC2 (Mn+N-P-B-) y PC3 (K+F-). La investigación de las cargas factoriales resultantes del análisis de tres conjuntos de datos mostró que habían interacciones negativas entre macronutrientes y micronutrientes.

Es bien conocido que el crecimiento óptimo de la planta no solo depende

in plants (Gunes and Alpaslan, 2000). Fageria (2009) reported that reduction in the absorption of Ca by increasing the K concentration in the growth medium reflects their competitive absorption pattern.

## Conclusion

Results of CND norms showed imbalances nutrient in the studied region. The zinc and nitrogen in soils are respectively deficient and adequate. Therefore, application of zinc especially and other micronutrient fertilizers must be applied at appropriate times. Comparison CND  $r^2$  in the surveyed fields and validation trial indicated that application micronutrient fertilizers decreased CND  $r^2$  then nutrients were more balanced. The close relationship between the CND.  $r^2$  and NII shows that both CND and DRIS methods produce similar diagnosis of nutrient balances. Principal component analysis (PCA) revealed that positive and negative interactions between nutrients which suggest that diagnosis of nutrients imbalance is impossible in isolation since a large number of nutrients either increase or decrease uptake of together in a clustered manner.

## Acknowledgments

This paper is published as a part of a Ph.D. dissertation supported by the Vice Chancellor for Research and Technology of the University of Tabriz, Iran. The authors are thankful to

de la cantidad total de nutrientes sino también de su disponibilidad. La disponibilidad de nutrientes es controlada por propiedades fisicoquímicas del suelo, tales como: clases de textura, carbono orgánico, carbonato de calcio, pH y conductividad eléctrica (Bell y Dell, 2008). Los suelos de la región estudiada se caracterizaron por bajo contenido de carbono orgánico, pH alto y problemas de salinidad/ alcalinidad (cuadro 1). Estas condiciones del suelo no son favorables para una adecuada disponibilidad de micronutrientes.

La aplicación de N aumenta la captación de P y Ca. El nitrógeno aumenta los pelos absorbentes de la raíz, ocasiona cambios en la rizosfera y cambios fisiológicos en la planta. Tales factores mejoran la absorción de macronutrientes (Baligar *et al.*, 2001). La interacción entre N y los micronutrientes depende de los cambios de pH en la rizosfera. El nitrógeno es absorbido como el nitrato, y aumenta el pH de la rizosfera, por lo tanto reduce la absorción de la mayoría de los nutrientes. Las plantas absorben más contenido de K más eficientemente que de Fe. El alto contenido de K evita la absorción y el transporte de Fe en las plantas, lo que provoca una deficiencia de Fe. Los investigadores reportaron que el uso tanto de F como de K en el suelo aumenta el rendimiento del sorgo (Matocha y Thomas, 1969). Los suelos que tienen una concentración baja de Zn mejoraron la concentración de B en el trigo (Singh *et al.*, 1990). La alta concentración de Ca evita la absorción

the University of Tabriz for financial supports.

### *End of English Version*

de Mg. La disminución en la absorción de Mg ocurre debido a la competencia entre Ca y Mg para los mismos lugares de absorción (Maas y Ogata, 1971). El trigo, impone efectos positivos sobre la absorción de P y un efecto negativo significativo sobre la absorción de Ca y Mg (Fageria, 2009). Los investigadores plantearon que existe una relación antagonista tanto entre B y Zn como entre Fe y Mn (Zaharieva, 1986; Chinnery y Harding 1980 y Singh *et al.*, 1990). Las interacciones entre B y P no son claras. El fósforo puede aumentar o disminuir la absorción de B o no puede tener efecto en él. Se ha encontrado que el uso de P, previene la acumulación tóxica de B en plantas (Gunes y Alpaslan, 2000). Fageria (2009) refirió que la reducción en la absorción de Ca por el aumento de la concentración de K en el crecimiento del medio refleja su patrón de absorción competitiva.

### Conclusión

Los resultados de las normas CND mostraron desequilibrios de nutrientes en la región estudiada. El zinc y el nitrógeno en los suelos son respectivamente deficientes y adecuados. Por lo tanto, la aplicación de zinc específicamente y de otros fertilizantes de micronutrientes deben ser aplicados en tiempos apropiados. La comparación de CND  $r^2$  en los campos evaluados y la validación del ensayo indicaron que la aplicación

de fertilizantes de micronutrientes disminuyeron CND  $r^2$ , por lo tanto los nutrientes fueron más equilibrados. La relación cercana entre CND  $r^2$  y NII muestra que ambos métodos de CND y DRIS producen un diagnóstico similar de balance de nutrientes. El análisis de componentes principales (PCA) reveló que hubo interacciones positivas y negativas entre los nutrientes, lo que sugiere que el diagnóstico del desequilibrio de nutrientes es imposible de forma aislada, ya que una gran cantidad de nutrientes aumentan o disminuyen la absorción juntos, de manera agrupada.

### Agradecimientos

Este artículo es publicado como una parte de la tesis de doctorado apoyada por el Vicerrectorado de Investigación y Tecnología de la Universidad de Tabriz, Irán. Los autores agradecen a la Universidad de Tabriz por el apoyo financiero.

### Literature cited

- Ali, A.M. 2018. Nutrient sufficiency ranges in Mango using boundary-line approach and compositional nutrient diagnosis norms in El-Salhiya, Egypt. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* Online publication.49:1-14
- Ali, A.M., S.M. Ibrahim and A.S.A. Sayed. 2016. Evaluation of nutritional balance in wheat using compositional nutrient diagnosis model in Sahl El-Tina, Egypt. *Alexandria Sci Exch. J.* 37(4):581-593.
- Bhargava, B.S. and H.B. Raghupathi. 1993. Analysis of plant material for macro- and micro-nutrients, pp. 49-82. *In: H.L.S. Tandon(ed.), Methods of Analysis of Soils, Plants, Waters*

- and Fertilizers. FDCO, New Delhi, India.\*Banaii, M. 2000. Soil resource and use potentiality map of Iran. Soil and water research institute (SWRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ministry of Agriculture-Jahad.
- Baligar, V.C., N.K. Fageria and Z.L. He. 2001. Nutrient use efficiency in plants: An overview. *Commun. Soil Sci. Plant. Anal.* 32:921–950.
- Bell, R.W. and B. Dell. 2008. Micronutrients for sustainable food, feed, fibre and bioenergy production. International Fertilizer Industry Association (IFA), Paris, France.
- Beaufils, E.R. 1973. Diagnosis and recommendation integrated system (DRIS) a general scheme for experimentation and calibration based on principles developed from research in plant nutrition. *Soil Science Bulletin* No1, Natal University, Pietermaritzburg.
- Chinnery, L.E.; Harding, C.P. 1980. The Effect of ferrous iron on the uptake of manganese by *Juncus effusus*. *Ann. Bot.* 46, 409- 412.
- Dezordi, L.R., L.A. Aquino, R.F.B.A. Aquino, J.M. Clemente and N.S. Assunção. 2016. Diagnostic Methods to Assess the Nutritional Status of the Carrot Crop. *Rev Bras Cienc Solo.* v40:e0140813.
- Fageria, N. K. 2009. The use of nutrients in crop plants. CRC Press. Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA. 448 p.
- Gott, R.M., L.A. Aquino, J.M. Clemente, L.P.D.D. Santos, A.M.X. Carvalho and F.O. Xavier. 2016. Foliar Diagnosis Indexes for Corn by the Methods Diagnosis and Recommendation Integrated System (DRIS) and Nutritional Composition (CND), *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 48:11-19
- Gunes, A. and M. Alpaslan. 2000. Boron uptake and toxicity in maize genotypes in relation to boron and phosphorus supply. *J. Plant Nutr.* 21:541–550.
- Gutiérrez-Acosta, F., R.D. Valdez-Cepeda, F. Blanco-Macias. 2002. Multivariate analysis of cactus pear (*Opuntia* spp.) fruits from a germplasm collection. *Acta. Hortic.* 581, 111–118
- Hallmark, W.B. and R.B. Beverly. 1991. Review – An update in the use of the diagnosis and recommendation integrated system. *J. Fert. Issu.* 8:74-88.
- Khiari, L., L.E. Parent and N. Tremblay. 2001a. Selecting the high-yield subpopulation for diagnosing nutrient imbalance in crops. *Agron. J.* 93:802-808.
- Khiari, L., L.E. Parent and N. Tremblay. 2001b. Critical compositional nutrient indexes for sweet corn at early growth stage. *Agron. J.* 93:809-814.
- Khiari, L., L.E. Parent and N. Tremblay. 2001c. The phosphorus compositional nutrient diagnosis range for potato. *Agron. J.* 93:815-819.
- Maas, E.V. and G. Ogata. 1971. Absorption of magnesium and chloride by excised corn roots. *Plant. Physiol.* 47:357–360.
- Matocha, J.E. and G.W. Thomas. 1969. Potassium and organic nitrogen content of grain sorghum as affected by iron. *Agron. J.* 61:425-428.
- Njoroge, R., A.N. Otinga, J.R. Okalebo, M. Pepela and R. Merckx. 2017. Occurrence of poorly responsive soils in western Kenya and associated nutrient imbalances in maize (*Zea mays* L.) *Field Crops Res.* 210:162–174.
- Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. 1982. *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties.* Soil Science Society of America, Madison, WI.
- Parent, L.E., D. Irfan, N. Tremblay and A. Karam. 1994. Multivariate nutrient diagnosis of the carrot crop. *J. Am. Soci. Hort. Sci.* 119:420-426.
- Parent, L.E. and M. Dafir. 1992. A theoretical concept of compositional nutrient diagnosis. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 117:239-242.



- Quintanar, R.M., R.D.V. Cepeda, E.O. Saenz, O.P. Veyna, J.L.G. Hernández and J.D.L. Martínez. 2006. Compositional nutrient diagnosis in maize grown in a calcareous soil. *J. Plant Nutr.* 29:2019-2033.
- Raghuptahi, H.B., Y.T.N. Reddy, R.M. Kurian and B.S. Bhargava. 2005. Diagnosis of nutrient imbalance in mango by DRIS and PCA approaches. *J. Plant Nutr.* 27(7):1131-1148.
- Singh, D., P.K. Chhonkar and B.S. Dwivedi. 2005. Manual on soil, plant and water analysis. New Delhi, India: Westville Publishing House.
- Singh, J.P., D.J. Dahiya and R.P. Narwal. 1990. Boron uptake and toxicity in wheat in relation to zinc supply. *Fert. Res.* 24:105-110.
- Wairegi, L. and P.V. Asten. 2011 Norms for multivariate diagnosis of nutrient imbalance in the east African highland bananas (*Musa* spp. AAA). *J. Plant. Nutr.* 34:1453-1472.
- Yousef, M.N., S. Akter, M.I. Haque, N. Mohammad and M.S. Zaman. 2013. Compositional nutrient diagnosis (CND) of Onion (*Allium cepa* L.). *Bangladesh J. Agril. Res.* 38: 271-287.
- Zaharieva, T. 1986. Comparative studies of iron inefficient plant species with plant analysis. *J. Plant Nutr.* 9, 939-946.

## Late blight resistance of Ecuadorian potato landraces: field evaluation and farmer's perception

Resistencia a lancha de papas nativas ecuatorianas: evaluación en campo y percepción de agricultores

Míldio de batata do Equador: avaliação de campo e percepção dos agricultores

Álvaro Monteros-Altamirano<sup>1\*</sup> and Ricardo Delgado<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos. Estación Experimental Santa Catalina. Quito. Código Postal: 171108. Correo electrónico: [alvaro.monteros@iniap.gob.ec](mailto:alvaro.monteros@iniap.gob.ec);  <sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, Programa Nacional de Banano y Plátano. Estación Experimental Litoral Sur. Correo electrónico: [Ricardo.delgado@iniap.gob.ec](mailto:Ricardo.delgado@iniap.gob.ec); 

### Abstract

Late blight, caused by *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, is one of the most devastating diseases of potato world-wide. A field experiment, in a location under high *P. infestans* pressure, was carried out in Ecuador to assess resistance or susceptibility to late blight of 31 potato landraces collected in Carchi, Chimborazo and Loja. Resistant commercial varieties (I-Fripapa) and a susceptible (Superchola) were included as references. Based on the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) three categories were scored: resistant, intermediate and susceptible. The landraces under study showed different responses to late blight in the experimental field. Only, five landraces showed the best field resistance: Uva, Chaucha roja, Guata amarilla, Coneja and Chaucha ratona. Additionally, a survey to 150 farmers growing potato landraces in these three provinces identified the main diseases affecting their potatoes. Informal conversations with these farmers both during the collections and during farmer meetings provided additional information regarding late blight and their perception of landrace resistance. Similar to farmers growing commercial varieties also farmers currently cultivating landraces consider late blight as the main disease in their potatoes. Probably the broad crop diversity on their farms and the planting of potato landrace mixtures reduces the late blight severity

Received el 20-04-2020 • Accepted el 11-12-2020

\*Corresponding author. Email: [alvaro.monteros@iniap.gob.ec](mailto:alvaro.monteros@iniap.gob.ec)

effects within their potato fields. Possible strategies to improve late blight resistance in potato in Ecuador could include the identification of accessions with resistance among local landraces, wild potato relatives and/or the introduction of new sources of resistance from other origins.

**Key words:** disease, AUDPC, diversity, *Phytophthora infestans*, *Solanum tuberosum* L.

## Resumen

La lancha (tizón tardío), causada por *Phytophthora infestans* es una de las enfermedades más devastadoras de la papa en el mundo. Un experimento de campo, en un lugar con alta presión de *P. infestans*, en Ecuador, permitió evaluar la resistencia o susceptibilidad a esta enfermedad en 31 variedades locales de papa recolectadas en Carchi, Chimborazo y Loja. Se incluyeron como referencias una variedad comercial resistente (I-Fripapa) y otra susceptible (Superchola). Con base en el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC), se establecieron tres categorías: resistente, intermedia y susceptible. Las variedades en estudio mostraron diferentes respuestas a la enfermedad y solo cinco variedades locales mostraron la mejor resistencia de campo: Uva, Chaucha roja, Guata amarilla, Coneja y Chaucha ratona. Además, una encuesta a 150 agricultores que cultivan variedades locales de papa en estas tres provincias identificó a la lancha como la más importante. Conversaciones informales durante las colectas y reuniones de estos agricultores, proporcionaron información sobre la resistencia de sus variedades locales a la lancha. Probablemente, la amplia diversidad de cultivos en sus granjas y la siembra de mezclas de variedades locales de papa reducen los efectos de severidad de la lancha dentro de sus campos. Una posible estrategia para mejorar la resistencia a lancha de papa puede ser la identificación de accesiones con resistencia entre variedades nativas locales, parientes silvestres de la papa o la introducción de nuevas fuentes de resistencia de otros orígenes.

**Palabras clave:** AUDPC, diversidad, *Phytophthora infestans*, *Solanum tuberosum* L.

## Resumo

Lancha (requeima), causada por *Phytophthora infestans*, é uma das doenças da batata mais devastadoras do mundo. Um experimento de campo, em local com alta pressão de *P. infestans*, no Equador, permitiu avaliar a resistência ou suscetibilidade a esta doença em 31 variedades locais de batata coletadas em Carchi, Chimborazo e Loja. Uma variedade comercial resistente (I-Fripapa) e outra suscetível (Superchola) foram incluídas como referências. Com base na área sob a curva de progresso da doença (AUDPC), foram estabelecidas três categorias: resistente, intermediário e suscetível. As variedades em estudo apresentaram diferentes respostas à doença e apenas cinco variedades locais apresentaram



a melhor resistência de campo: Uva, Chaucha, Roja, Guata amarilla, Coneja e Chaucha ratona. Além disso, uma pesquisa com 150 agricultores que cultivam variedades locais de batata nessas três províncias identificou o barco como o mais importante. Conversas informais durante as coletas e reuniões desses agricultores forneceram informações sobre a resistência de suas variedades locais ao barco. Provavelmente, a grande diversidade de culturas em suas fazendas e o plantio de misturas de variedades locais de batata reduzem os efeitos da severidade do barco em seus campos. Uma possível estratégia para melhorar a resistência à lancha de batata pode ser a identificação de acessos com resistência entre variedades nativas locais, parentes selvagens da batata ou a introdução de novas fontes de resistência de outras origens.

**Palavras chave:** AUDPC, diversidade, *Phytophthora infestans*, *Solanum tuberosum* L.

## Introduction

Late blight, caused by *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, is one of the most devastating diseases of potato world-wide (Birch and Whisson, 2001). The disease is also a limiting factor in potato production in Ecuador (Oyarzún *et al.*, 2002). It has been observed that under extreme climatic conditions, the potato crop can be destroyed within a few days after the first symptoms are visible (Oyarzún *et al.*, 2001). All the information on the importance of late blight is based on commercially grown potatoes in Ecuador. However, Ecuadorian farmers also maintain old potato landraces in their fields (Monteros *et al.*, 2017). These landraces have endured biotic and abiotic stresses for generations and are still maintained under low input conditions.

Resistance to late blight may be based on vertical resistance or horizontal resistance. Vertical resistance is based on major genes which include amongst others the so-called the NBS-LRR type of resistance

## Introducción

El Tizón tardío, causado por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, es una de las enfermedades más devastadoras de la papa en todo el mundo (Birch y Whisson, 2001). Ésta enfermedad es también un factor limitante en la producción de la papa en Ecuador (Oyarzún *et al.*, 2002). Se ha observado que, bajo condiciones climáticas extremas, el cultivo de papa puede ser destruido dentro de pocos días, después de los primeros síntomas visibles (Oyarzún *et al.*, 2001). Toda la información sobre la importancia del tizón tardío se basa en papas cultivadas comercialmente en Ecuador. Sin embargo, agricultores ecuatorianos también mantienen variedades autóctonas de papa en sus campos (Monteros *et al.*, 2017). Estas variedades locales han soportado estrés biótico y abiótico durante generaciones y aún se mantienen en condiciones de bajo consumo.

La resistencia al tizón tardío puede basarse en la resistencia vertical o la resistencia horizontal.



genes (nucleotide binding site, NBS and leucine rich repeat region, LRR). Such resistance (R)-genes often originate from wild relatives of potato (Van der Vossen *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2008; Pel *et al.*, 2009; Lokossou *et al.*, 2010; Jacobs *et al.*, 2010). Horizontal resistance, also known as quantitative or field resistance, is based on multiple genes that each have a relatively small effect and, in theory, render the host partially resistant to all races of the pathogen (Pereira *et al.*, 2012). Some authors consider field resistance more stable than resistance based on R-genes (Pereira *et al.*, 2012; Wulff *et al.*, 2007; Brown and Caligari, 2008). However, also pyramiding of R-genes has been suggested as a strategy for obtaining late blight resistance (Tan *et al.*, 2010).

The Andean cultivated potatoes *S. tuberosum* ssp. *andigenum* and *S. phureja* are reported to have quantitative resistance (Cañizares and Forbes, 1995; Pereira *et al.*, 2012). Perez *et al.* (2014) assessed wild and cultivated potato accessions for resistance to the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*, wide phenotypic variation was found. Gabriel *et al.* (2007), found good quantitative resistance in *S. tuberosum* ssp. *andigenum* accessions when compared to accessions of *S. stenotomum*, *S. juzepczukii* and *S. ajanhuiri* from Bolivia. In evaluations of Ecuadorian landraces of *S. phureja*, mostly susceptible material was found, but also some accessions with field resistance to late blight were identified (Cañizares and Forbes, 1995). One of the resistant accessions

La resistencia vertical se basa en genes principales que incluyen, entre otros, el denominado tipo de genes de resistencia NBS-LRR (sitio de unión de nucleótidos, NBS y región de repetición rica de leucina, LRR). Tales genes de resistencia (R) a menudo se originan en parientes silvestres de la papa (Van der Vossen *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2008; Pel *et al.*, 2009; Lokossou *et al.*, 2010; Jacobs *et al.*, 2010). La resistencia horizontal, también conocida como cuantitativa o resistencia de campo, se basa en múltiples genes, cada uno tiene un efecto relativamente pequeño y, en teoría, hace que el huésped sea parcialmente resistente a todas las razas del patógeno (Pereira *et al.*, 2012). Algunos autores consideran que la resistencia de campo es más estable que la resistencia basada en genes R (Pereira *et al.*, 2012; Wulff *et al.*, 2007; Brown y Caligari, 2008). Sin embargo, también se ha sugerido la piramidación de genes R como una estrategia para obtener resistencia al tizón tardío (Tan *et al.*, 2010).

Las papas andinas cultivadas *S. tuberosum* ssp. *andigenum* y *S. phureja* reportan que tienen resistencia cuantitativa (Cañizares y Forbes, 1995; Pereira *et al.*, 2012). Pérez *et al.* (2014) evaluaron accesiones de papa silvestre y cultivada para la resistencia al patógeno oomiceto *Phytophthora infestans*, y se encontró una amplia variación fenotípica. Gabriel *et al.* (2007), encontraron buena resistencia cuantitativa en accesiones de *S. tuberosum* ssp. *Andigenum* en comparación con las

of *S. phureja* (CHS-625) was crossed with a susceptible *S. tuberosum* DH line (PS-3) producing a dihaploid hybrid population that segregated for quantitative resistance (Trognitz *et al.*, 2001). In this population QTLs associated with field resistance to late blight under short-day conditions were identified (Ghislain *et al.*, 2001; Trognitz *et al.*, 2002). Also two PR-1 genes have been isolated and proposed to play a role in horizontal late blight resistance in *S. phureja* (Evers *et al.*, 2006). In conclusion, Andean potatoes show quite some variation in resistance to late blight, but unfortunately many of them are susceptible. However, field resistance does exist and accessions with this characteristic have been used in breeding programs.

In this study selected Ecuadorian landraces from three provinces were evaluated for late blight resistance under natural conditions. This evaluation was connected with the farmers' perception on their landraces in relation to late blight resistance and their understanding of potato landrace management in the field.

## Materials and methods

### Plant materials

Thirty-one Ecuadorian potato landraces collected in the provinces of Carchi, Chimborazo and Loja, which are areas of high potato diversity, were included in this study. Three of these landraces are classified as *S. tuberosum* diploid Andigenum Group; one landrace as *S. tuberosum* triploid Andigenum Group; and 27 landraces as *S. tuberosum* tetraploid Andigenum

accessiones de *S. stenotomum*, *S. juzepczukii* y *S. ajanhuiri* de Bolivia. En evaluaciones de las variedades locales ecuatorianas de *S. phureja* se encontró material mayormente susceptible, pero también se identificaron algunas accesiones con resistencia de campo al tizón tardío (Cañizares y Forbes, 1995). Una de las accesiones resistentes de *S. phureja* (CHS-625) fue cruzada con una línea susceptible de *S. tuberosum* DH (PS-3) produciendo una población híbrida diploide que se segrega por la resistencia cuantitativa (Trognitz *et al.*, 2001). En esta población fueron identificados QTLs asociados con el campo de resistencia al tizón tardío bajo condiciones de días cortos (Ghislain *et al.*, 2001; Trognitz *et al.*, 2002). También, dos genes de PR-1 han sido aislados y propuestos para jugar un rol en la resistencia horizontal del tizón tardío en *S. phureja* (Evers *et al.*, 2006). En conclusión, las papas andinas muestran bastante variación en la resistencia al tizón tardío, pero, desafortunadamente muchas de ellas son susceptibles. Sin embargo, la resistencia de campo existe y las accesiones con estas características han sido usadas en programas de crianza.

En este estudio, variedades locales ecuatorianas seleccionadas de tres provincias fueron evaluadas por su resistencia al tizón tardío bajo condiciones naturales. Esta evaluación se relacionó con la percepción de agricultores sobre sus variedades locales en relación a la resistencia del tizón tardío y

Group (Spooner *et al.*, 2007; Spooner *et al.*, 2014). The ploidy levels of all the materials were confirmed by flow cytometry as described in Monteros *et al.* (2017). The 31 landraces were selected from 152 native potatoes, which had been genotyped previously with 8 SSRs (Monteros *et al.*, 2017).

Farmers from Carchi, which is at the border with Colombia, provided 'Parda mejorada' and 'Parda pastusa' as landraces. However, there are also Colombian commercial varieties under these names. According to Ñustez (2011), the Colombian 'Parda pastusa', was produced by a cross ['Quincha' (*S. tuberosum* ssp. *andigenum*) x 'Tocana colorada' (*S. tuberosum* ssp. *andigenum*)]. The material of 'Parda pastusa' used in this study was triploid, therefore considered as landrace. No additional information was gotten on 'Parda mejorada'. 'Uva' was collected as a landrace but turned out to be genetically distant from all other potato landraces (Monteros *et al.*, 2017). It is apparently a spontaneous hybrid Andigenum x Chilotanum (Ghislain *et al.*, 2009). In this study resistant cultivar (I-Fripapa) and a susceptible (Superchola) were included as reference (Pumisacho and Velásquez, 2009).

### Farmer's information

One hundred fifty surveys were conducted with farmers growing potato landraces in the provinces of Carchi, Chimborazo and Loja (Monteros, 2018). The survey included a question regarding the main diseases affecting the potato landraces. Farmers provided common names of the diseases affecting their landraces. This information was compared to Oyarzún *et al.* (2002) who

su entendimiento del manejo de variedades locales de papa en el campo.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Treinta y un variedades locales ecuatorianas recolectadas en las provincias de Carchi, Chimborazo y Loja, las cuales son áreas de alta diversidad de papa, fueron incluidas en este estudio. Tres de estas variedades locales son clasificadas como *S. tuberosum* diploide Grupo Andigenum; una variedad local como *S. tuberosum* triploide Grupo Andigenum; y 27 variedades locales como *S. tuberosum* tetraploide Grupo Andigenum (Spooner *et al.*, 2007; Spooner *et al.*, 2014). Los niveles de ploidía de todos los materiales fueron confirmados por flujo citométrico, como lo descrito por Monteros *et al.* (2017). Las treinta y un variedades locales fueron seleccionadas de 152 papas nativas, las cuales habían sido genotipadas previamente con 8 SSRs (Monteros *et al.*, 2017).

Agricultores de Carchi, al el límite con Colombia, proporcionaron "Parda mejorada" y "Parda pastusa" como variedades locales. Sin embargo, también existen variedades comerciales colombianas bajo estos nombres. De acuerdo con Ñustez (2011), La "Parda pastusa" colombiana, fue producida por un cruce ['Quincha' (*S. tuberosum* ssp. *andigenum*) x 'Tocana colorada' (*S. tuberosum* ssp. *andigenum*)]. El material de "Parda pastusa" usado en este estudio fue triploide, por lo tanto,

described potato diseases present in Ecuador. Also, informal conversations with farmers both during the collections and during farmer meetings provided information regarding late blight and their perception of landrace resistance.

### Field experiment

A field experiment was carried out to assess resistance or susceptibility of Ecuadorian potato landraces to late blight. The experiment was conducted in Quito at the Santa Catalina Experimental Station (EESC) of the National Institute for Agricultural Research (INIAP) located at 3050 m.a.s.l, Longitude: 78°33'15" and Latitude: 00°22'4" S. The average annual temperature is 13 °C, the annual precipitation: 1432.1 mm, and the relative humidity (annual average) 72.5 % (data from Izobamba Meteorological Station, in EESC). This location was selected because it is under high *P. infestans* pressure. In the past, 36 complex races of *P. infestans* were identified at this location (Tello, 2008).

A complete random block design with four repetitions was used. The landraces were planted in single row plots of ten plants per repetition, with a plant spacing of 0.25 m and a row spacing of 1.0 m. One application of contact fungicide (Mancozeb) was done after 30 days of emergence to protect the plants from complete devastation by late blight. This protocol is common practice at Santa Catalina station due to the high disease pressure. It is also recommended by the International Potato Center (2006).

The plant materials were evaluated under natural infection pressure. The severity of the foliage damage caused by late blight (as a percentage of leaf

es considerado como variedad local. No se obtuvo información adicional sobre 'Parda mejorada'. 'Uva' fue recolectada como una variedad local, pero resultó ser genéticamente distante de todas aquellas variedades locales de papa (Monteros *et al.*, 2017). Esta es aparentemente un híbrido espontáneo de *Andigenum* x *Chilotanum* (Ghislain *et al.*, 2009). En este estudio fueron incluidos el cultivar resistente (I-Fripapa) y uno susceptible (Superchola) como referencia (Pumisacho y Velásquez, 2009).

### Información de agricultores

Ciento cincuenta encuestas fueron conducidas por agricultores que siembran variedades locales de papa en las provincias de Carchi, Chimborazo y Loja (Monteros, 2018). La encuesta incluyó una pregunta con respecto a las principales enfermedades que afectan las variedades locales de papa. Los agricultores proporcionaron nombres comunes de las enfermedades que afectan sus variedades locales. Esta información fue comparada con Oyarzún *et al.* (2002) quien describió las enfermedades de la papa presentes en Ecuador. También, conversaciones informales con agricultores durante las recolecciones y las reuniones proporcionaron información con respecto al tizón tardío y su percepción de la resistencia de variedades locales.

### Experimento de campo

Un experimento de campo se llevó a cabo para evaluar la resistencia o susceptibilidad de variedades locales de papas ecuatorianas al tizón tardío. El experimento se desarrolló en Quito en la Estación Experimental de

surface) was assessed every 7 days for 4 weeks. The evaluation started when the first symptoms were observed (62 days after emergence). The late blight assessments were used to calculate the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) following Forbes *et al.* (2014):

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i)/2] [X_{i+1} - X_i]$$

In which  $Y_i$  = late blight severity (per plot) at the  $i$ th observation,  $X_i$  = time (days) at the  $i$ th observation, and  $n$  = total number of observations.

Disease severity is evaluated as the percentage of foliage area that is infected, the higher the AUDPC the more disease in the genotype. A 0 to 9 scale is used to identify resistant, moderately resistance and susceptible genotypes but a reference is needed (Forbes *et al.*, 2014).

### Data analysis

SAS (release 9.1, SAS Institute, Inc., Cary, NC) was used to perform an ANOVA analysis. A LSD Fisher test on the AUDPC data was performed in Infostat® (Di Rienzo *et al.*, 2008) to determine the statistical significance of the differences among the landraces.

## Results and discussion

### Response to late blight of the selected Ecuadorian landraces

The Analysis of Variance for the model  $\text{AUDPC} = \text{Blocks} + \text{landraces}$ , was highly significant ( $F= 4.16$ ;  $P= 0.0001$ ). The variation among blocks was not significant ( $F= 0.33$ ;  $P= 0.8285$ ) and the variation among landraces highly significant ( $F= 4.52$ ;  $P= 0.0001$ ).

Santa Catalina (EESC) del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIAP) localizado a 3050 m. s. n. m., Longitud: 78°33'15" y Latitud: 00°22'4" S. El promedio anual de temperatura es 13 °C, la precipitación anual: 1432,1 mm, y la humedad relativa (promedio anual) 72,5 % (datos de la estación meteorológica de Izobamba, en EESC). Esta localidad fue seleccionada por estar bajo alta presión de *P. infestans*. En el pasado, 36 razas complejas de *P. infestans* fueron identificadas en esta localidad (Tello, 2008).

Se usó un diseño de bloques completamente al azar con cuatro repeticiones. Las variedades locales fueron plantadas en parcelas de una sola fila de diez plantas por repetición, con una distancia de planta de 0,25 m y una distancia entre filas de 1,0 m. Una aplicación de fungicida de contacto (Mancozeb) fue hecha después de 30 días de emergencia para proteger a las plantas de una completa devastación por tizón tardío. Este protocolo es una práctica común en la Estación de Santa Catalina debido a la alta presión de la enfermedad. Esto es también recomendado por El centro internacional de la papa (2006).

Los materiales vegetales fueron evaluados bajo presión de infección natural. La severidad del daño del follaje causado por el tizón tardío (Como un porcentaje de la superficie de la hoja) se evaluó cada 7 días por 4 semanas. La evaluación comenzó cuando los primeros síntomas fueron observados (62 días después de la emergencia). Las evaluaciones del tizón tardío fueron usadas para calcular el Área bajo la curva de

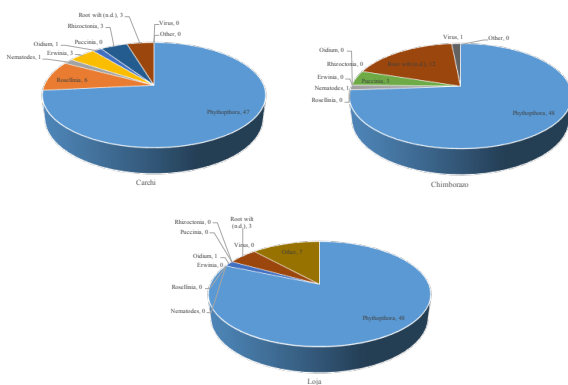
**Table 1. Late blight resistance of the Ecuadorian potato landraces and the two varieties.** Common names of the landraces, origin, collection code, AUDPC values, LSD and ploidy levels are shown.

**Cuadro 1. Resistencia al tizón tardío de las razas locales de papas ecuatorianas y dos variedades.** Se muestran nombres comunes de variedades locales, origen, código de colección, los valores AUDPC, LSD y los niveles de ploidía.

Landrace	Province	Code	Ploidy	AUDPC (average)	LSD*
Uva	Carchi	JS-2	4x	331	A
Chaucha roja	Loja	MPG-028	4x	374	AB
Guata amarilla	Loja	MG-007	4x	427	ABC
Coneja	Chimborazo	FM RA FH 002	4x	434	ABC
Chaucha ratona	Carchi	AXC-028	2x	505	ABC
Fripapa (Var.)			4x	507	ABC
Superchola (Var.)			4x	557	ABCD
Negra, Carriza or Catalina	Loja	MOPG-002	4x	589	BCD
Super violeta	Carchi	AXC-004	4x	597	BCD
Violeta común	Carchi	AXC-025	4x	599	BCD
Curipamba	Carchi	AXC-016	4x	628	BCDE
Colorada chaucha	Loja	MOPG-004	4x	663	BCDE
Parda Pastusa	Carchi	AC-042	3x	692	BCDE
Morasurco	Carchi	AXC-009	4x	696	BCDE
Puña negra	Chimborazo	FM FH RA 002	4x	711	BCDEF
Negra ojona	Loja	MG-011	4x	714	CDEF
Parda mejorada	Carchi	AXC-020	4x	716	CDEF
Bodeguera blanca	Loja	MOPG-009	4x	723	CDEF
Semibolona	Loja	MG-014A	4x	759	CDEF
Negra	Loja	MPG-033	4x	761	CDEF
Colorada	Loja	MOPG-003	4x	768	CDEF
Carriza	Loja	MPG-020	4x	778	CDEF
Tulca hembra	Chimborazo	XCFM-19	4x	781	CDEFG
Sulipamba	Carchi	AXC-003	4x	788	DEFG
Colorada antigua	Loja	MPG-042	4x	842	DEFG
Roja plancha	Carchi	AXC-030	4x	891	DEFG
Papa chacra	Loja	MPG-021	2x	914	DEFG
Rabo de gato	Carchi	AC-040	2x	917	DEFG
Manuela	Chimborazo	AMFY-1	4x	917	EFG
Rosada	Carchi	AXC-029	4x	919	EFG
Cuchi chupa	Chimborazo	FMFYRA IV 005	4x	1013	FG
Cacho blanco	Chimborazo	FM RA FH 002	4x	1069	FG
Sabanera	Carchi	AC-034	4x	1125	G

\*Different letters indicate significant difference at  $\alpha = 0.05$ .

\*Letras diferentes indican diferencias significativas en  $\alpha = 0,05$ .



**Figure 1. Number of respondents that mentioned a disease affecting potato landraces in three provinces of Ecuador (n=145).** All the diseases mentioned by the farmers are included (sometimes more than one per farmer).

**Figura 1. Número de encuestados que mencionaron una enfermedad que afecta a las variedades locales de papa en tres provincias de Ecuador (n = 145).** Se incluyen todas las enfermedades mencionadas por los agricultores (a veces más de una por agricultor).

The LSD test ranked the landraces according to their field response to late blight (Table 1). A total of 5 landraces and 2 varieties were ranked as most resistant. Three of these landraces are from the *S. tuberosum* tetraploid Andigenum Group: 'Uva', 'Guata amarilla', 'Coneja' and 'Chaucha roja' and one from the *S. tuberosum* diploid Group: 'Chaucha ratona'. The landrace 'Chaucha roja' is an early-sprouting potato but tetraploid while 'Chaucha ratona' is a diploid early-sprouting landrace. The landrace 'Uva' performed the best.

The most susceptible group included the landraces: 'Tulca hembra', 'Sulipamba', 'Colorada antigua', 'Roja plancha', 'Papa chacra', 'Rabo de gato', 'Manuela', 'Rosada', 'Cuchi chupa', 'Cacho blanco' and 'Sabanera'.

The remaining landraces were ranked as intermediate in late blight

progreso de la enfermedad (AUDPC) siguiendo a Forbes *et al.* (2014):

$$AUDPC = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i)/2] [X_{i+1} - X_i]$$

En la cual  $Y_i$  = severidad del tizón tardío (por parcela) en la observación  $ith$ ,  $X_i$  = tiempo (días) en la observación  $ith$ , y  $n$  = número total de observaciones.

La severidad de la enfermedad es evaluada como el porcentaje del área del follaje infectada, a más alta AUDPC, más enfermedad en el genotipo. Se usó una escala de 0 a 9 para identificar genotipos resistentes, moderadamente resistentes y susceptibles, pero se necesitó una referencia (Forbes *et al.*, 2014).

### Análisis de datos

Se usó el programa SAS (Versión 9.1, SAS Institute, Inc., Cary, NC) para realizar un análisis ANOVA. Se utilizó un test LSD de Fisher con los datos de



resistance (moderately resistant). These landraces include: 'Negra Carrizo-Catalina', 'Super violeta', 'Violeta común', 'Curipamba', 'Colorada chaucha', 'Parda pastusa', 'Morasurco', 'Puña negra', 'Negra ojona', 'Parda mejorada', 'Bodeguera blanca', 'Semibolona', 'Negra', 'Carriza' and 'Colorada'.

### Ecuadorian landraces and late blight performance

The landraces under study showed different responses to late blight in the experimental field. Most of them turned out to be moderately resistant to susceptible (Table 1), which is in line with reports on landraces from other parts of the Andes (Perez *et al.*, 2014; Solano *et al.*, 2014). Five landraces (one diploid and four tetraploid) showed the best field resistance. The performance of these landraces was similar to the tetraploid variety 'I-Fripapa', which is a leading variety in Ecuador and reported as resistant (Oyarzún *et al.*, 2001; Perez and Forbes, 2007) or moderately resistant (Cáceres *et al.*, 2008). The variety 'Superchola' is believed to be susceptible (Pumisacho and Velásquez, 2009), but was not significantly different from the most resistant landraces in the field experiment. The landrace 'Uva' performed the best and is believed to have *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* in its pedigree which may have donated its resistance (Solano *et al.*, 2014).

### Diseases affecting Ecuadorian potato landraces

A total of 145 farmers provided information about the main diseases affecting their potato landraces (47 from

AUDPC en Infostat® (Di Rienzo *et al.*, 2008) para determinar significancia estadística de las diferencias entre las variedades locales.

## Resultados y discusión

### Respuesta de las variedades ecuatorianas seleccionadas al tizón tardío

Análisis de varianza para el modelo AUDPC = Bloques+ variedades locales, fue altamente significativa ( $F= 4,16$ ;  $P= 0,0001$ ). La variación entre bloques no fue significativa ( $F= 0,33$ ;  $P= 0,8285$ ) y la variación entre variedades locales fue altamente significativa ( $F= 4,52$ ;  $P= 0,0001$ ).

El test LSD calificó las variedades locales de acuerdo a sus respuestas de campo al tizón tardío (Cuadro 1). Un total de 5 variedades locales y 2 variedades fueron clasificadas como las más resistentes. Tres de estas variedades locales son de *S. tuberosum* tetraploide Grupo Andigenum: 'Uva', 'Guata amarilla', 'Coneja' y 'Chaucha roja' y una *S. tuberosum* diploide Grupo Andigenum: 'Chaucha ratona'. La variedad local 'Chaucha roja' es una papa de brotación temprana, pero tetraploide, mientras la 'Chaucha ratona' es una variedad local diploide de brotación temprana. La variedad local 'Uva' tuvo el mejor desempeño.

El grupo más susceptible incluyó las variedades locales: 'Tulca hembra', 'Sulipamba', 'Colorada antigua', 'Roja plancha', 'Papa chacra', 'Rabo de gato', 'Manuela', 'Rosada', 'Cuchi chupa', 'Cacho blanco' y 'Sabanera'.

Las variedades locales restantes fueron calificadas como intermedias



Carchi, 49 in Chimborazo and 49 in Loja). Farmers mentioned nine diseases affecting their potatoes. The number of times a respondent mentioned a disease is shown in Figure 1. Late blight, in Ecuador known as 'Lancha', was most frequently mentioned in the three areas. The second important disease in Carchi was 'Lanosa' (*Rosellinia* sp.) and in Chimborazo and Loja: 'Pudrición de la raíz', which is root wilt (in this case the pathogen is unknown). The farmers from Loja mentioned more local common names of diseases than in the other areas, but the associated pathogens are unknown. These diseases were grouped under the category "Other".

Similar to farmers growing commercial varieties (Ortiz *et al.*, 2001) also farmers currently cultivating landraces consider late blight as the main disease in their potatoes (Figure 1). Other diseases were mentioned but these are less important. Farmers are aware of differences in late blight response among their landraces. They know that certain landraces are more resistant or susceptible than others. For example, 'Sulipamba' is considered susceptible by the farmers, which was confirmed in the field experiment (Table 1). Similarly, 'Uva' was considered resistant by the farmer who provided the landrace.

Changes in the response of landraces to late blight have been noticed by farmers. In Carchi farmers mentioned that 'Violeta', 'Curipamba' and 'Morasurco' were the more resistant landraces in the past. In the field trial these landraces ended up in the intermediate group. These changes might be related to the

en la resistencia del tizón tardío (moderadamente resistente). Estas variedades locales incluyen: 'Negra-Carrizo-Catalina', 'Super violeta', 'Violeta común', 'Curipamba', 'Colorada chaucha', 'Parda pastusa', 'Morasurco', 'Puña negra', 'Negra ojona', 'Parda mejorada', 'Bodeguera blanca', 'Semibolona', 'Negra', 'Carriza' y 'Colorada'.

### **Variedades locales ecuatorianas y su respuesta al tizón tardío**

Las variedades locales bajo estudio mostraron respuestas diferentes al tizón tardío en el experimento de campo. La mayoría de ellas resultaron ser moderadamente resistentes a susceptibles (Tabla 1), lo cual está relacionado con los reportes sobre variedades locales de diferentes partes de los Andes (Perez *et al.*, 2014; Solano *et al.*, 2014). Cinco variedades locales (Una diploide y cuatro tetraploides) mostraron la mejor resistencia de campo. El rendimiento de estas variedades locales fue similar a la variedad tetraploide 'I-Fripapa', la cual es una variedad líder en Ecuador reportada como resistente (Oyarzún *et al.*, 2001; Perez y Forbes, 2007) o moderadamente resistente (Cáceres *et al.*, 2008). La variedad 'Superchola' se consideró como susceptible (Pumisacho y Velásquez, 2009), pero no fue significativamente diferente a las variedades locales más resistentes en el experimento de campo. La variedad local 'Uva' se desempeñó mejor y se cree que tiene *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* en su constitución genética, que puede haber aportado su resistencia (Solano *et al.*, 2014).

appearance of more virulent races of *P. infestans*. Adler *et al.* (2004) reported EC-1, EC-2, EC-3 and US-1 *P. infestans* populations. Delgado *et al.* (2013) confirmed that *P. infestans* attacking potato in the Ecuadorian highlands (Carchi, Chimborazo and Loja) is of the EC-1 clonal lineage with high variability.

### **Management practices of farmers**

It is interesting that farmers have managed to maintain these mostly susceptible landraces for centuries. Apparently, there are other characteristics that promote the continued use of the landraces, despite their lack of late blight resistance. Ortiz *et al.* (2001) already mentioned that farmers preferred particular cultivars for other reasons than late blight resistance. For example, in this study the landrace *Sulipamba* was determined as susceptible, but local farmers appreciate its taste.

There are also management practices that decrease the impact of late blight on their potato crop. Farmers growing potato landraces do not only keep potatoes, but a much broader crop diversity on their farms (Monteros *et al.*, 2017). This crop diversity may provide protection to diseases by inter-cropping and crop rotation (Garrett *et al.*, 2001; Shambulingappa and Mansur, 2018). An example is the susceptible landrace 'Papa de chacra', which is grown within corn fields "as weedy potato" with no pesticide application. Another common practice among the farmers is planting potato landraces in mixtures. This can reduce potato late blight

### **Enfermedades que afectan a las variedades locales ecuatorianas de papa**

Un total de 145 agricultores proporcionaron información sobre las principales enfermedades que afectan a sus variedades locales de papa (47 de Carchi, 49 de Chimborazo y 49 de Loja). Los agricultores mencionaron nueve enfermedades que afectan a sus papas. El número de veces que un encuestado mencionó una enfermedad se muestra en la Figura 1. El tizón tardío, en Ecuador conocido como "Lancha", fue mencionado con mayor frecuencia en las tres áreas. La segunda enfermedad importante en Carchi fue 'Lanosa' (*Rosellinia* sp.) y en Chimborazo y Loja: 'Podrición de la raíz', la cuales marchitez de la raíz (En este caso el patógeno es desconocido). Los agricultores de Loja, mencionaron más nombres comunes locales de enfermedades que en otras áreas, pero los patógenos asociados son desconocidos. Estas enfermedades fueron agrupadas bajo la categoría 'Otros'.

Al igual que los agricultores que cultivan variedades comerciales (Ortiz *et al.*, 2001), los agricultores que actualmente cultivan variedades locales consideran que el tizón tardío es la principal enfermedad de sus papas (Figura 1). Se mencionaron otras enfermedades, pero estas son menos importantes. Los agricultores son conscientes de las diferencias en la respuesta al tizón tardío entre sus variedades locales. Ellos saben que ciertas variedades locales son más resistentes o susceptibles que otras. Por ejemplo, los agricultores consideran que 'Sulipamba' es susceptible, lo que se

severity as observed by Andrivon *et al.* (2003) and Pilet *et al.* (2006). We observed different landraces of potatoes and also different ploidy levels intermixed in farmer fields (Monteros *et al.*, 2017).

Potato landraces were managed organically in the past. The appearance of new commercial cultivars e.g. 'Superchola' and 'I-Fripapa' has brought new management practices to the commercial potatoes. A large range of fungicides and excessive use of them has been documented in commercial potatoes in Ecuador (Ortiz *et al.*, 2001; Yanggen *et al.*, 2003). Pesticide application on the commercial varieties is now a common practice and farmers are also increasing their use of potato landraces. Currently 64% of the farmers in Carchi, 58% in Chimborazo and 60% in Loja are managing landraces similarly to commercial varieties (Monteros *et al.*, 2017). Finally, farmers growing landraces are aware of ways to escape late blight; e.g. farmers in Loja skip the heavy rainy season to avoid losses due to late blight attack (Monteros *et al.*, 2017).

### Perspectives for late blight resistance breeding

From this study (Table 1) and previous reports, it is clear that there is variation in the level of resistance to late blight in Ecuadorian landraces (Cañizares and Forbes, 1995). Possible strategies to improve late blight resistance in potato in Ecuador could include the identification of accessions with resistance among local landraces and/or the introduction

confirmó en el experimento de campo (Cuadro 1). De manera similar, la 'Uva' fue considerada resistente por el agricultor que proporcionó la variedad local.

Cambios en la respuesta de las variedades locales al tizón tardío han sido observados por los agricultores. En Carchi, agricultores mencionaron que la 'Violeta', 'Curipamba' y 'Morasurco' fueron las variedades locales más resistentes en el pasado. En la prueba de campo, estas variedades locales terminaron en el grupo intermedio. Estos cambios pueden estar relacionados con la aparición de razas más virulentas de poblaciones de *P. infestans*. Adler *et al.* (2004) reportaron poblaciones de *P. infestans* EC-1, EC-2, EC-3 y US-1. Delgado *et al.* (2013) confirmaron que *P. infestans* ataca la papa en las tierras altas ecuatorianas (Carchi, Chimborazo y Loja), es del linaje clonal EC-1 con alta variabilidad.

### Prácticas de manejo de los agricultores

Es interesante que los agricultores hayan logrado mantener estas variedades locales, en su mayoría susceptibles, durante siglos. Aparentemente, existen otras características que promueven el uso continuo de variedades locales, a pesar de su falta de resistencia al tizón tardío. Ortiz *et al.* (2001) han mencionado, que los agricultores prefieren cultivares particulares por otras razones además de la resistencia al tizón tardío. Por ejemplo, en este estudio se determinó la variedad local *Sulipamba* como susceptible, pero los agricultores locales aprecian su sabor.

of new sources of resistance from other origins. A screening of the available potato germplasm could be carried out including potato wild relatives (Naranjo *et al.*, 2018). However, considering our results on a selection of landraces that represents the available diversity quite well (Monteros *et al.*, 2017), this might not lead to much improvement as most landraces turned out to be moderately resistant to susceptible.

Previous experiences with the release of varieties carrying R-genes in Ecuador showed that the resistance was quickly overcome by the *P. infestans* population (Oyarzún *et al.*, 2001). This probably is due to the high variability of the *P. infestans* populations present in the Ecuadorian highlands (Adler *et al.*, 2004; Tello, 2008). As an alternative, the pyramiding of novel R-genes obtained from different sources has been proposed to improve late blight resistance and its durability (Tan *et al.*, 2010; Verzaux, 2010). However, we have to keep in mind that several of the R-genes have already been defeated. Therefore, a careful selection has to be made based on the frequency of the different races and composition of the *P. infestans* population. It is encouraging that recent research identified several novel R-genes in wild tuber bearing *Solanum* species that will be useful (Wang *et al.*, 2008; Pel *et al.*, 2009; Jacobs *et al.*, 2010). In addition, it might be a viable strategy to introduce these novel R-genes in material that already contains some level of quantitative resistance, as suggested by Stewart *et al.* (2003).

Existen prácticas de manejo que disminuyen el impacto del tizón tardío en sus cultivos de papa. Los agricultores que cultivan variedades locales de papa no solo mantienen papas, sino una diversidad de cultivos mucho más amplia en sus fincas (Monteros *et al.*, 2017). Esta diversidad de cultivos puede brindar protección contra enfermedades mediante cultivos intercalados y rotación de cultivos (Garrett *et al.*, 2001; Shambulingappa y Mansur, 2018). Un ejemplo es la variedad local susceptible “Papa de chacra”, la cual se cultiva en los campos de maíz “como papa maleza” sin aplicación de pesticidas. Otra práctica común entre los agricultores es plantar variedades locales de papa en mezclas. Esto puede reducir la severidad del tizón tardío de la papa como lo observado por Andrivon *et al.* (2003) y Pilet *et al.* (2006). Observamos diferentes variedades locales de papa y también diferentes niveles de ploidía entremezclados en los campos de los agricultores (Monteros *et al.*, 2017).

Las variedades locales de papa fueron manejadas orgánicamente en el pasado. La aparición de nuevos cultivares comerciales e.g. ‘Superchola’ y ‘I-Fripapa’ ha brindado nuevas prácticas de manejo a las papas comerciales. Una amplia gama de fungicidas y un excesivo uso de ellos han sido documentados en las papas comerciales en Ecuador (Ortiz *et al.*, 2001; Yanggen *et al.*, 2003). La aplicación de pesticidas en las variedades comerciales es ahora una nueva práctica común y los agricultores también han

## Conclusions

Farmers growing potato landraces in three areas of high diversity of potatoes, identified late blight as the most important disease.

Based on the AUDPC scores we distinguish three categories: resistant, intermediate and susceptible. Five landraces (and two commercial varieties grown as controls) showed the best field resistance. However, there is no doubt that more tests in various locations are necessary to verify the resistance or susceptibility of landraces.

## Acknowledgements

Authors thanks the guidance by Ben Vosman and Ronald van den Berg from Wageningen University and Research Centre, The Netherlands. To NUFFIC the Dutch Organization for internationalization in education for supporting scholarships.

### End of English Version

incrementado su uso en variedades locales de papa. Actualmente el 64% de los agricultores en Carchi, 58% en Chimborazo y 60% en Loja están manejando las variedades locales similarmente a las variedades comerciales (Monteros *et al.*, 2017). Finalmente, los agricultores que cultivan variedades locales son conscientes de las formas de escapar del tizón tardío; p.ej. los agricultores de Loja se saltan la temporada de lluvias intensas para evitar pérdidas debido al ataque del tizón tardío (Monteros *et al.*, 2017).

## Perspectivas para la reproducción de resistencia al tizón tardío

A partir de este estudio (Cuadro 1) y de informes anteriores, queda claro que existe una variación en el nivel de resistencia al tizón tardío en las variedades locales ecuatorianas (Cañizares y Forbes, 1995). Las posibles estrategias para mejorar la resistencia al tizón tardío en la papa en Ecuador podrían incluir la identificación de accesiones con resistencia entre razas locales y / o la introducción de nuevas fuentes de resistencia de otros orígenes. Se podría realizar una selección del germoplasma de papa disponible, incluyendo los parientes silvestres de la papa (Naranjo *et al.*, 2018). Sin embargo, considerando nuestros resultados sobre una selección de variedades locales que representa bastante bien la diversidad disponible (Monteros *et al.*, 2017), esto podría no conducir a una gran mejora ya que la mayoría de las variedades locales resultaron ser moderadamente resistentes a susceptibles.

Experiencias anteriores con la liberación de variedades portadoras de genes R en Ecuador mostraron que la resistencia fue superada rápidamente por la población de *P. infestans* (Oyarzún *et al.*, 2001). Esto probablemente se deba a la alta variabilidad de las poblaciones de *P. infestans* presentes las tierras altas ecuatorianas (Adler *et al.*, 2004; Tello, 2008). Como alternativa, se ha propuesto la piramidación de nuevos genes R obtenidos de diferentes fuentes para mejorar la resistencia al tizón tardío y su durabilidad (Tan *et*

al., 2010; Verzaux, 2010). Sin embargo, debemos tener en cuenta que varios de los genes R ya han sido derrotados. Por lo tanto, se debe hacer una selección cuidadosa basada en la frecuencia de las diferentes razas y la composición de la población de *P. infestans*. Es alentador que una investigación reciente haya identificado varios genes R nuevos en especies de *Solanum* portadoras de tubérculos silvestres que serán útiles (Wang *et al.*, 2008; Pel *et al.*, 2009; Jacobs *et al.*, 2010). Además, podría ser una estrategia viable introducir estos nuevos genes R en material que ya contiene algún nivel de resistencia cuantitativa, como sugirieron Stewart *et al.* (2003).

## Conclusiones

Los agricultores que cultivan variedades locales de papa en tres áreas de alta diversidad de papas, identificaron al tizón tardío como la enfermedad más importante.

Con base en los puntajes del AUDPC, distinguimos tres categorías: resistente, intermedio y susceptible. Cinco variedades locales (y dos variedades comerciales cultivadas como controles) mostraron la mejor resistencia de campo. Sin embargo, no hay duda de que son necesarias más pruebas en varios lugares para verificar la resistencia o susceptibilidad de las variedades locales.

## Agradecimientos

Los autores agradecen la orientación de Ben Vosman y Ronald van den Berg de la Universidad

y Centro de Investigación de Wageningen, Países Bajos. A NUFFIC, la organización holandesa para la internacionalización en educación por el apoyo de becas.

## Cited literature

- Adler, N.E., L.J. Erselius, M.G. Chacón, W.G. Flier, M.E. Ordoñez, L.P.N.M. Kroon and G.A. Forbes. 2004. Genetic Diversity of *Phytophthora infestans* sensu lato in Ecuador Provides New Insight Into the Origin of This Important Plant Pathogen. *Phytopathology*. 94(2): 154-162.
- Andrison, D., J. Lucas and D. Ellissèche. 2003. Development of natural late blight epidemics in pure and mixed plots of potato cultivars with different levels of partial resistance. *Plant. Pathol.* 52(5): 586-594.
- Birch, P. and S. Whisson. 2001. *Phytophthora infestans* enters the genomics era. *Mol. Plant Pathol.* 2(5): 257-263.
- Brown, J. and P. Caligari. 2008. An introduction to plant breeding. Blackwell Publishing, Singapore. 209 p.
- Cáceres, P., M. Pumisacho, G. Forbes and J. Andrade. 2008. Learning to control potato late blight - A facilitator's guide. International Potato Center (CIP), Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT). 142 p.
- Cañizares, G. and G. Forbes. 1995. Foliage resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the Ecuadorian national collection of *Solanum phureja* ssp. *phureja* Juz. & Buk. *Potato Res.* 38(1): 3-10.
- Delgado, R., A. Monteros, Y. Li, R. Visser, T. Van Der Lee and B. Vosman. 2013. Large subclonal variation in *Phytophthora infestans* populations associated with Ecuadorian potato landraces. *Plant Pathol.* 62(5): 1081-1088.



- Di Rienzo, J., F. Casanoves, M. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada and C. Robledo. 2008. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Evers, D., C. Schweitzer, N. Nicot, S. Gigliotti, M. Herrera, J. Hausman, L. Hoffmann, B. Trognitz, J. Dommes and M. Ghislain. 2006. Two PR-1 loci detected in the native cultivated potato *Solanum phureja* appear differentially expressed upon challenge by late blight. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 67(3-5): 155-163.
- Forbes, G., W. Perez and J. Andrade. 2014. Field assessment of resistance in potato *Phytophthora infestans*. Lima (Peru). International Potato Center (CIP). 35 p.
- Gabriel, J., A. Coca, G. Plata and J. Parlevliet. 2007. Characterization of the resistance to *Phytophthora infestans* in local potato cultivars in Bolivia. *Euphytica.* 153(3): 321-328.
- Garrett, K., R. Nelson, C. Mundt, G. Chacón, R. Jaramillo and G. Forbes. 2001. The effects of host diversity and other management components on epidemics of potato late blight in the humid highland tropics. *Phytopathology.* 91(10): 993-1000.
- Ghislain, M., B. Trognitz, M. Herrera, J. Solis, G. Casallo, C. Vásquez, O. Hurtado, R. Castillo, L. Portal and M. Orrillo. 2001. Genetic loci associated with field resistance to late blight in offspring of *Solanum phureja* and *S. tuberosum* grown under short-day conditions. *Theor. Appl. Genet.* 103(2-3): 433-442.
- Ghislain, M., J. Núñez, M. Herrera and D. Spooner. 2009. The single Andigenum origin of Neo-Tuberosum potato materials is not supported by microsatellite and plastid marker analyses. *Theor. Appl. Genet.* 118(5): 963-969.
- International Potato Center [CIP]. 2006. Procedures for standard evaluation trials of advanced potato clones. An International Cooperators' Guide. 124 p. Disponible en: <https://research.cip.cgiar.org/confluence/download/attachments/14942262/ICG.pdf?version=1>
- Jacobs, M., B. Vosman, V. Vleeshouwers, R. Visser, B. Henken and R. Van den Berg. 2010. A novel approach to locate *Phytophthora infestans* resistance genes on the potato genetic map. *Theor. Appl. Genet.* 120(4):785-796.
- Lokossou, A., H. Rietman, M. Wang, P. Krenek, H. Van der Schoot, B. Henken, R. Hoekstra, V. Vleeshouwers, E. Van der Vossen, R. Visser, E. Jacobsen and B. Vosman. 2010. Diversity, distribution and evolution of *Solanum bulbocastanum* Late Blight resistance genes. *MPMI.* 23(9): 1206-1216.
- Monteros, A., J. Buitrón, K. Orbe and X. Cuesta. 2017. Ecuadorian potato landraces: traditional names and genetic identity. *Rev. Fitotec. Mex.* 40(4): 481-489.
- Monteros, A. 2018. *On-farm* conservation of potato landraces in Ecuador. *Agron. Colomb.* 36(3): 198-200.
- Naranjo, E., L. Rosero, C. Tapia, A. Monteros, M. Tacán, L. Lima, G. Peña, N. Paredes and J. Villarroel. 2018. Ecuadorian catalogue of wild species related to sweetpotato, rice, lima bean (butter bean), potato and eggplant. INIAP. National Department of Plant Genetic Resources. Santa Catalina Experimental Station. Miscelaneous publication No. 455. Mejía-Ecuador. INIAP-Global Crop Diversity Trust. 24 p.
- Ñustez, C. 2011. Variedades Colombianas de papa. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 50 p. Disponible en: <https://drive.google.com/file/d/0B0d7qZ6xkUiiRTVzdzd5dnFsdjg/view>. Fecha de consulta: noviembre 2020.
- Oyarzún, P., J. Taipe and G. Forbes. 2001. *Phytophthora infestans* characteristics and activity in Ecuador. Country profile. p. 17-28. In: Fernández-Northcote E. (Ed.) Proceedings of the International Workshop Complementing resistance

- to late blight *Phytophthora infestans* in the Andes. February 13-16, 2001, Cochabamba-Bolivia.
- Oyarzún, P., P. Gallegos, C. Asaquibay, G. Forbes, J. Ochoa, B. Paucar, M. Prado, J. Revelo, S. Sherwood and F. Yumisaca. 2002. Manejo integrado de plagas y enfermedades. p85-131. *In*: Pumishacho M. and S. Sherwood (Eds.). El cultivo de la papa en el Ecuador. INIAP-CIP. Available in: <https://repositorio.iniap.gob.ec/jspui/bitstream/41000/2802/4/iniapsc190.pdf>
- Ortiz, O., G. Thiele and G. Forbes. 2001. Farmer's knowledge and practices regarding fungicide use for late blight control in the Andes. p 45 - 56. *In*: Fernández-Northcote E (Ed.) Proceedings of the International Workshop Complementing resistance to late blight *Phytophthora infestans* in the Andes. February 13-16, 2001, Cochabamba-Bolivia.
- Pel, M., S. Foster, T. Park, H. Rietman, G. Van Arkel, J. Jones, H. Van Eck, E. Jacobsen, R. Visser and Van der E. Vossen. 2009. Mapping and cloning of Late Blight resistance genes from *Solanum venturii* using an interspecific candidate gene approach. *MPMI*. 22 (5): 601-615.
- Pereira, A., C.B. Gomes, C.M. Castro and G.O. da Silva. 2012. Breeding for Fungus Resistance. p. 13 - 35. *In*: Fritsche-Neto R, Borém A. (Eds) Plant Breeding for Biotic Stress Resistance. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-33087-2\_2
- Perez, W. and G. Forbes. 2007. Qué es la resistencia genética? Manejo integrado del Tizón Tardío. Hoja divulgativa 3. Centro Internacional del Papa. 4p.
- Pérez, W., D. Ellis and G.A. Forbes. 2014. Wide Phenotypic Diversity for Resistance to *Phytophthora infestans* Found in Potato Landraces from Peru. *Plant Dis*. 98 (11): 1530-1533.
- Pilet, F., G. Chacón, G. Forbes and D. Andrivon. 2006. Protection of Susceptible Potato Cultivars Against Late Blight in Mixtures Increases with Decreasing Disease Pressure. *Phytopathology*. 96 (7): 777-783.
- Pumisacho, M. and Velásquez J. 2009. Manual del cultivo de papa para pequeños productores. INIAP-COSUDE, Quito. 98 p.
- Shambulingappa, B. and C. Mansur. 2018. Traditional practices to overcome weeds, pests and diseases in agricultural crops: A study among farmers in Haveri district, Karnataka state, India. *Int. J. Chem. Stud*. 6(6): 1578-1582
- Solano, J., I. Acuña, F. Esnault, and P. Brabant. 2014. Resistance to *Phytophthora infestans* in *Solanum tuberosum* landraces in Southern Chile. *Trop. Plant Pathol*. 39(4):307-315.
- Spooner, D., J. Nuñez, G. Trujillo, R. Herrera, F. Guzmán and M. Ghislain. 2007. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *PNAS*. 104(49): 19398-19403.
- Spooner D., M. Ghislain, R. Simon, S.H. Jansky and T. Gavrilenko. 2014. Systematics, Diversity, Genetics, and Evolution of Wild and Cultivated Potatoes. *Bot. Rev*. 80(4): 283-383.
- Stewart, H., J. Bradshaw and B. Pande. 2003. The effect of the presence of R-genes for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) of potato (*Solanum tuberosum*) on the underlying level of field resistance. *Plant Pathol*. 52(2): 193-198.
- Tan, M., R. Hutten, B. Celis, T. Park, R. Niks, R. Visser and H. Van Eck. 2008. The Rpi-mcd1 Locus from *Solanum microdontum* involved in resistance to *Phytophthora infestans*, causing a delay in infection, maps on potato chromosome 4 in a cluster of NBS-LRR genes. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 21(7): 909-918.
- Tan, M., R. Hutten, R. Visser and H. Van Eck. 2010. The effect of pyramiding *Phytophthora infestans* resistance



genes RPi-mcd1 and RPi-ber in potato. *Theor. Appl. Genet.* 121(1): 117–125.



- Tello, C. 2008. Identificación de aspectos epidemiológicos relacionados con la expresión de resistencia de la papa (*Solanum tuberosum*) para las poblaciones de *Phytophthora infestans* predominantes en tres localidades de la sierra ecuatoriana. Tesis de Grado. Universidad Central del Ecuador, Quito. 95 p.
- Trognitz, B., M. Orrillo, L. Portal, C. Román, P. Ramón, S. Perez and G. Chacón. 2001. Evaluation and analysis of reduction of late blight disease in a diploid potato population. *Plant Pathol.* 50: 281-291.
- Trognitz, F., P. Manosalva, R. Gysin, D. Niño-Liu, R. Simon, M. Herrera, B. Trognitz, M. Ghislain and R. Nelson. 2002. Plant Defense Genes Associated with Quantitative Resistance to Potato Late Blight in *Solanum phureja* × Dihaploid *S. tuberosum* Hybrids. *MPMI.* 15(6): 587–597.
- Van der Vossen, E., A. Sikkema, B. Hekkert, J. Gros, P. Stevens, M. Muskens, D. Wouters, A. Pereira, W. Stiekema and S. Allefs. 2003. An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant J.* 36(6): 867-882.
- Verzaux, E. 2010. Resistance and susceptibility to late blight in *Solanum*: gene mapping, cloning and stacking. Tesis Doctoral, Wageningen University, Wageningen, NL. 144 p. Disponible en: <https://edepot.wur.nl/139193>.
- Wang, M., S. Allefs, R. Van den Berg, V. Vleeshouwers, E. Van der Vossen and B. Vosman. 2008. Allele mining in *Solanum*: conserved homologues of Rpi-blb1 are identified in *Solanum stoloniferum*. *Theor. Appl. Genet.* 116(7): 933–943.
- Wulff, E., W. Perez, R. Nelson, M. Bonierbale, J. Landeo and G. Forbes. 2007. Identification of stable resistance to *Phytophthora infestans* in potato genotypes evaluated in field experiments in Peru. *Exp. Agric.* 43(3): 353–363.
- Yanggen, D., D. Cole, C. Crissman and S. Sherwood. 2003. Human health, environmental, and economic effects of pesticide use in potato production in Ecuador. Research Brief. International Potato Center. Disponible en: <https://vtechworks.lib.vt.edu/handle/10919/68992>. Fecha de consulta: noviembre 2020.

## Mineralización de nitrógeno en suelos cultivados con plátano (*Musa* AAB Subgrupo plátano cv. Hartón), estado Zulia, Venezuela

Nitrogen mineralization in soils cultivated with plantain (*Musa* AAB Subgroup plátano cv. Hartón), Zulia state, Venezuela

Mineralização do Nitrogênio em solos cultivados com plátano (*Musa* AAB Subgrupo plátano cv. Hartón), estado Zulia, Venezuela

Ana Francisca González-Pedraza<sup>1,2\*</sup> y Juan Carlos Escalante<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Pamplona. Facultad de Ciencias Agrarias. Programa de Ingeniería Agronómica. Campus Universitario, km 1 carretera vía a Bucaramanga. Pamplona, Norte de Santander, Colombia. Código Postal: 5430. <sup>2</sup>Universidad Nacional Experimental Sur del Lago “*Jesús María Semrpum*” (UNESUR). Programa Ingeniería de la Producción Agropecuaria. Campus Universitario Hacienda La Glorieta. Santa Bárbara, municipio Colón, estado Zulia, Venezuela. Código Postal: 5148. Correo electrónico: anagonzalez11@gmail.com, . <sup>3</sup>Universidad de Pamplona. Facultad de Ciencias Agrarias. Programa de Ingeniería Agronómica. Campus Universitario, km 1 carretera vía a Bucaramanga. Pamplona, Norte de Santander, Colombia. Código Postal: 5430. Correo electrónico: jcescalante1212@gmail.com, .

### Resumen

La principal fuente de nitrógeno (N) en el suelo es la materia orgánica, por lo tanto, su disponibilidad depende de la cantidad y calidad de ésta, de la actividad microbiana, de las características del suelo y del manejo. Una manera eficaz de cuantificar el N disponible es mediante su mineralización como amonio ( $\text{N-NH}_4^+$ ) y nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ). Por lo tanto, en este estudio se determinó el N total y disponible en muestras de suelos de 0-20 cm de profundidad provenientes de dos lotes con plantas de plátano (*Musa* AAB subgrupo plátano cv. Hartón) con alto y bajo vigor (AV y BV, respectivamente), en el Sur del Lago de Maracaibo, Venezuela. El N total se determinó por el método Kjeldahl y la mineralización

Recibido el 11-06-2020 • Aceptado el 03-09-2020.

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: anagonzalez11@gmail.com

del N disponible mediante incubación bajo condiciones de laboratorio durante 10 semanas. Se calculó el N mineralizado acumulado (Nm), la tasa constante de mineralización de ( $k$ ) y el N potencialmente mineralizable (N0). Se aplicó un análisis de la varianza de una vía, cuando resultó significativo ( $p < 0,05$ ), se aplicó una prueba de Tukey para comparaciones múltiples de medias. El N total fue bajo ( $< 0,025\%$ ) y no presentó diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre AV y BV. El N-NO<sub>3</sub> mineralizado acumulado resultó estadísticamente ( $p < 0,05$ ) superior (524,47 mg.kg<sup>-1</sup>) en BV, mientras que el N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no presentó diferencias entre AV y BV.  $k$  resultó estadísticamente mayor ( $0,07 \pm 0,03$ ;  $p < 0,05$ ) solamente en BV. La nitrificación fue el proceso que prevaleció especialmente en BV donde el carbono orgánico fue mayor y además presentó un porcentaje de arena más alto.

**Palabras clave:** amonio, nitrato, incubación, suelos, vigor de plantas.

### Abstract

The main source of N in the soil is organic matter; therefore, its availability depends on its quantity and quality, microbial activity, soil characteristics and management. An efficient way to quantify available N is by mineralizing it as ammonium (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) and nitrate (N-NO<sub>3</sub>). Therefore, in this study, the total and available N was determined in soil samples 0-20 cm deep from two plots with plantain plants (*Musa* AAB plantain subgroup cv. Hartón) with high and low vigor (AV and BV, respectively), in the South of Lake Maracaibo. Total N was determined by the Kjeldahl method and the mineralization of available N by incubation under laboratory conditions for 10 weeks. The accumulated mineralized N (Nm), the constant mineralization rate of ( $k$ ) and the potentially mineralizable N (N0) were calculated. A one-way analysis of variance was applied, when it was significant ( $p < 0.05$ ), a Tukey test was applied for multiple comparisons of means. Total N was low ( $< 0.025\%$ ) and did not present statistical differences ( $p < 0.05$ ) between AV and BV. The accumulated mineralized N-NO<sub>3</sub> was statistically ( $p < 0.05$ ) higher (524.47 mg.kg<sup>-1</sup>) in BV, while the N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> did not present differences between AV and BV. Only  $k$  was statistically higher ( $0.07 \pm 0.03$ ;  $p < 0.05$ ) in BV. Nitrification was the process that prevailed especially in BV where organic carbon was higher and presented a higher percentage of sand.

**Keywords:** ammonia, nitrate, incubation, soils, plant vigor.

### Resumo

A principal fonte de N do solo é a matéria orgânica, portanto, sua disponibilidade depende de sua quantidade e qualidade, atividade microbiana, características do solo e manejo. Uma maneira eficiente de quantificar o N disponível é mineralizá-lo como amônio (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e nitrato (N-NO<sub>3</sub>). Portanto, neste estudo o N total e disponível foi determinado em amostras de solo de 0-20 cm de profundidade de dois lotes com plantas de plantain (*Musa* AAB subgrupo de plantain cv.

Hartón) com alto e baixo vigor (AV e BV, respectivamente), no sul do Lago de Maracaibo. O N total foi determinado pelo método de Kjeldahl e a mineralização do N disponível por incubação em condições de laboratório por 10 semanas. Foram calculados o N mineralizado acumulado (Nm), a taxa de mineralização constante de ( $k$ ) e o N potencialmente mineralizável (N0). A análise de variância unilateral foi aplicada, quando esta foi significativa ( $p < 0,05$ ), o teste de Tukey foi aplicado para comparações múltiplas de médias. O % N total foi baixo ( $< 0,025$  %) e não apresentou diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre AV e BV. O N-NO<sub>3</sub> mineralizado acumulado foi estatisticamente ( $p < 0,05$ ) maior (524,47 mg.kg<sup>-1</sup>) no VB, enquanto o N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> não apresentou diferenças entre AV e BV. Apenas  $k$  foi estatisticamente maior ( $0,07 \pm 0,03$ ;  $p < 0,05$ ) no BV. A nitrificação foi o processo que prevaleceu principalmente no BV onde o carbono orgânico foi maior e também apresentou maior porcentagem de areia.

**Palavras chaves:** Amônio, nitrato, solos, vigor, plantas, pesquisa, incubação

## Introducción

El nitrógeno (N) es un elemento muy dinámico en los suelos tropicales y además es requerido en grandes cantidades para el crecimiento de las plantas. Su eficiencia se ha podido evidenciar por la rápida tasa de mineralización y la alta disponibilidad en el suelo y en los restos vegetales (Ju y Zhang, 2017). La mineralización de nitrógeno consiste en una serie de procesos mediados principalmente por los microorganismos del suelo, a través de los cuales los componentes orgánicos son transformados a formas inorgánicas (Masunga *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017). La mineralización de N depende, entre otros factores, de la cantidad y tipo de materia orgánica, de la actividad de los microorganismos, de las condiciones físicas y químicas del suelo y del tipo de manejo dado a los suelos (Dai *et al.*, 2017; Campos *et al.*, 2019; Mahal *et al.*, 2019).

Uno de los métodos que más ha sido utilizado para estimar la tasa

## Introduction

Nitrogen (N) is a very dynamic element in tropical soils and is required in large quantities for plant growth. Its efficiency is evidenced by the rapid rate of mineralization and high availability in the soil and plant debris (Ju and Zhang, 2017). Nitrogen mineralization consists of a series of processes mediated mainly by soil microorganisms, through which organic components are transformed into inorganic forms (Masunga *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017). The mineralization of N depends, among other factors, on the amount and type of organic matter, the activity of microorganisms, the physical and chemical conditions of the soil and the type of management given to the soils. (Dai *et al.*, 2017; Campos *et al.*, 2019; Mahal *et al.*, 2019).

One of the methods that has been used to estimate the mineralization rate of N, as well as the amount of N mineralized during a given time,

de mineralización de N así como la cantidad de N mineralizado durante un tiempo determinado fue desarrollado por Stanford y Smith (1972), a través de la siguiente ecuación:

$$Nm = N_0 (1 - e^{-k \cdot t})$$

Donde Nm: es la cantidad de N mineralizado acumulado en un período específico de tiempo; N0: es el N orgánico del suelo potencialmente mineralizable; t: es el tiempo en semanas y k es la constante de velocidad de mineralización. El N0 representa la cantidad de N orgánico del suelo susceptible de ser transformada a formas inorgánicas solubles como amonio y nitrato, a través de la biomasa microbiana aerobia heterótrofa (Ju y Zhang, 2017). La determinación del N0 constituye una manera eficaz de cuantificar el N disponible para las plantas, lo cual permite realizar recomendaciones sobre fertilización y estrategias de manejo (Masunga *et al.*, 2016).

La producción de plátano juega un papel muy importante en la economía y sostenibilidad alimentaria en América Latina y el Caribe debido a que constituye una significativa fuente de empleo e ingresos (Gutiérrez, 2010; 2020). En Venezuela, la región del Sur del Lago de Maracaibo presenta excelentes condiciones agroecológicas para la producción de Musáceas, en especial de plátano. Sin embargo, uno de los factores que afecta la producción de plátano es la disponibilidad de nutrientes en los suelos, entre ellos el nitrógeno, el cual es requerido en grandes cantidades

was developed by Stanford and Smith (1972), using the following equation:

$$Nm = N_0 (1 - e^{-k \cdot t})$$

Where Nm = mineralized N accumulated at time t; N0 = potentially mineralizable N; t = time in weeks and k = mineralization constant. N0 represents the amount of organic soil N forms that can become soluble inorganic ammonium and nitrate, through the heterotrophic aerobic microbial biomass (Ju and Zhang, 2017). The N0 determination is an effective way to quantify the N available to plants, which allows making recommendations on fertilization and management strategies (Masunga *et al.*, 2016).

Plantain production plays a very important role in the economy and food sustainability in Latin America and the Caribbean because it constitutes a significant source of employment and income (Gutiérrez, 2010; 2020). In Venezuela, the southern region of Lake Maracaibo presents excellent agroecological conditions for the production of Musaceae, especially plantain. However, the main factors that affect plantain production are the availability of nutrients in the soils, including nitrogen; which is required in large quantities by the plant. Additionally, nitrogen is supplied through the indiscriminate application of chemical fertilizers by farmers, without considering not only the costs of production, but also the damage to health and the environment (Aular and Casares, 2011).

por la planta y es suplido a través de la aplicación indiscriminada de fertilizantes químicos por parte de los productores, sin considerar no sólo los costos de producción, sino el daño a la salud y al ambiente (Aular y Casares, 2011).

Una alternativa para reducir la cantidad de fertilizante químico aplicado la constituye la determinación de la cantidad de N que el suelo es capaz de proveer a las plantas (Herrera *et al.*, 2017; Meya *et al.*, 2020). Es por ello que, en este estudio se planteó evaluar la mineralización de nitrógeno en suelos cultivados con plátano con el fin de orientar las estrategias de manejo y realizar recomendaciones apropiadas de fertilización.

## Materiales y métodos

### Área de estudio

El estudio se realizó en la Unidad de Producción Agrícola Socialista Bicentenario ubicada en Pueblo Nuevo, municipio Francisco Javier Pulgar del estado Zulia, Venezuela. Se trata de una zona cuyos suelos se han formado a partir de la deposición de sedimentos provenientes de la Cordillera de los Andes acarreados principalmente por el río Chama. Esta condición ha permitido el desarrollo de suelos relativamente fértiles, pero con problemas de mal drenaje asociado a la predominancia de texturas finas (MARNR, 1978).

Los suelos de estudio fueron descritos por González-Pedraza *et al.* (2014) como ligeramente ácidos a moderadamente ácidos, con porcentaje de carbono orgánico medio, clase textural franco limoso y franco en los

An alternative to reduce the amount of chemical fertilizer applied is the determination of the amount of N that the soil is capable of providing the plants (Herrera *et al.*, 2017; Meya *et al.*, 2020). Due to this, it was proposed to evaluate nitrogen mineralization in soils cultivated with plantain in order to guide management strategies and make appropriate fertilization recommendations.

## Materials and methods

### Study area

The study was carried out at the Bicentennial Socialist Agricultural Production Unit located in Pueblo Nuevo, Francisco Javier Pulgar municipality of Zulia state, Venezuela. It is an area whose soil has been formed from the deposition of sediments from the Andes Mountains carried mainly by the Chama River. This condition has allowed the development of relatively fertile soils, but with poor drainage problems associated with the predominance of fine textures (MARNR, 1978).

The study soils were described by González-Pedraza *et al.*, (2014) as slightly acidic to moderately acidic, with average organic carbon percentage, silty loam and loam textural class in the plots of plants with high vigor and low vigor, respectively (table 1).

### Design of the experiment and soil sampling

An experiment was carried out with a directed systematic random design (Otzen and Manterola, 2017), in which the treatments consisted of

**Cuadro 1. Determinación de algunas características físicas y químicas en los suelos de lotes de plantas de plátano de alto y bajo vigor en la Unidad de Producción Agrícola Socialista Bicentenario ubicada en Pueblo Nuevo, municipio Francisco Javier Pulgar del estado Zulia, Venezuela.**

**Table 1. Determination of some physical and chemical characteristics in the soils of plots of high and low vigor plantain plants in the Bicentennial Socialist Agricultural Production Unit located in Pueblo Nuevo, Francisco Javier Pulgar municipality of Zulia state, Venezuela.**

Parámetro	Vigor de las plantas	
	Alto vigor	Bajo vigor
pH	6,12±0,69 <sup>a</sup>	5,87±0,60 <sup>a</sup>
Conductividad eléctrica (dS.m <sup>-1</sup> )	0,036±0,017 <sup>a</sup>	0,032±0,016 <sup>a</sup>
Carbono orgánico (%)	1,8±0,52 <sup>a</sup>	2,5±0,48 <sup>b</sup>
Humedad (%)	34,47±3,39 <sup>a</sup>	30,08±3,21 <sup>b</sup>
Arcilla (%)	11,19±4,05 <sup>a</sup>	10,20±3,37 <sup>a</sup>
Limo (%)	59,67±12,21 <sup>a</sup>	38,65±10,83 <sup>b</sup>
Arena (%)	29,13±13,54 <sup>a</sup>	51,15±13,17 <sup>b</sup>
Grupo textural	Franco limoso	Franco

<sup>a,b</sup>Valores promedios ± desviación estándar acompañados por letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticas ( $P < 0,05$ ) entre lotes de plantas de alto y bajo vigor (González-Pedraza *et al.*, 2014).

<sup>a,b</sup>Mean values ± standard deviation accompanied by different lowercase letters indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ) between plots of high and low vigor plants (González-Pedraza *et al.*, 2014).

lotes de plantas de alto vigor y bajo vigor, respectivamente (cuadro 1).

### Diseño del experimento y toma de muestras de suelos

Se realizó un experimento con un diseño aleatorio sistemático dirigido (Otzen y Manterola, 2017), en el cual los tratamientos consistieron en dos lotes, un lote con plantas de alto vigor y otro lote con plantas de bajo vigor, en una superficie de 4 ha cada uno y cuyas características de suelos se mencionan en el cuadro 1. Cada lote fue dividido en cuatro parcelas de aproximadamente 1

two plots, a lot with high vigor plants and another lot with low vigor plants, in an area of 4 ha each one and whose soil characteristics are mentioned in table 1. Each lot was divided into four plots of approximately 1 ha each and within each plot a subplot of 1 000 m<sup>2</sup> corresponding to the repetitions was delimited. Within each subplot, two transects were drawn on which 3 simple soil samples were taken (6 samples for each subplot) at a depth of 0-20 cm for a total of 24 simple soil samples per lot or treatment.



ha cada uno y dentro de cada parcela se delimitó una subparcela de 1.000 m<sup>2</sup> correspondiente a las repeticiones. Dentro de cada subparcela se trazaron dos transectas sobre las cuales se tomaron 3 muestras simples de suelo (6 muestras por cada subparcela) a una profundidad de 0-20 cm para un total de 24 muestras simples de suelos por lote o tratamiento.

### Vigor de las plantas

Para seleccionar las plantas de alto y bajo vigor se siguió el criterio propuesto por Rodríguez y Rodríguez (1998), quienes señalan que las plantas con alto vigor son las plantas madres con una circunferencia del pseudotallo de 76 cm, tomada a 1 m desde la base del tallo, mientras que las plantas con valores inferiores serían de bajo vigor.

En cada subparcela (1.000 m<sup>2</sup>) se marcaron 20 plantas que estuvieran a tres semanas de ser cosechadas, aproximadamente.

Posteriormente, a cada planta madre se le midió la circunferencia del pseudotallo a un metro de altura sobre la superficie del suelo, se contó el número de manos por racimo y se midió la altura del hijo de sucesión (medida desde el nivel del suelo hasta la inserción del pseudopéculo de la última hoja candela expandida).

La densidad de plantas por hectárea en cada subparcela se determinó multiplicando el número total de plantas presentes por 10 para relacionarlo a una hectárea. Los resultados del vigor de las plantas de este estudio fueron reportados por González-Pedraza *et al.* (2014) (cuadro 2).

### Plants vigor

To select high and low vigor plants, was followed the criterion proposed by Rodríguez and Rodríguez (1998), who point out that mother plants with high vigor are those that have a pseudostem circumference of 76 cm (taken from 1 m of the base of the stem at ground level), while plants with lower values are considered low vigor. In each subplot, (1000 m<sup>2</sup>) 20 plants were marked, with approximately three weeks remaining before harvested.

Subsequently, the circumference of the pseudostem of the mother plant was measured at a height of one meter from the plant base at ground level, the number of hands per bunch was counted and the height of the successional son was measured (measured from the ground level to the insertion of the pseudopetiole of the last expanded candle leaf).

The density of plants per hectare in each subplot was determined by multiplying the total number of plants present by 10 to relate it to one hectare. González-Pedraza *et al.* (2014) reported the results of the plants vigor in this study (table 2).

### Percentage of total nitrogen (N)

The percentage of total N was determined in the soil samples of each lot of high and low vigor of the plants, with the Kjeldahl method, which is based on the digestion of the soil sample in concentrated sulfuric acid and oxidation with peroxide of hydrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Fleck and Munro, 1965).

**Porcentaje de nitrógeno (N) total**

El porcentaje de N total se determinó en las muestras de suelo de cada lote de alto y bajo vigor de las plantas, a través del método Kjeldahl,

**Nitrogen mineralization process**

The mineralization process was carried out under controlled laboratory conditions following the methodology proposed by Stanford

**Cuadro 2. Parámetros de productividad en los lotes de plantas de plátano con alto y bajo vigor en la Unidad de Producción Agrícola Socialista Bicentenario ubicada en Pueblo Nuevo, municipio Francisco Javier Pulgar del estado Zulia, Venezuela.**

**Table 2. Productivity parameters in the plots of plantain plants with high and low vigor in the Bicentennial Socialist Agricultural Production Unit located in Pueblo Nuevo, Francisco Javier Pulgar municipality of Zulia state, Venezuela.**

Parámetro	Vigor de las plantas	
	Alto	Bajo
Número de manos por racimo	6,44±0,97 <sup>a</sup>	4,94±0,90 <sup>b</sup>
Circunferencia pseudotallo (cm)	80,95±5,65 <sup>a</sup>	65,68±5,45 <sup>b</sup>
Altura del hijo (m)	2,61±0,39 <sup>a</sup>	1,50±0,38 <sup>b</sup>
Densidad (plantas.ha <sup>-1</sup> )	1.410	1.400

<sup>a,b</sup>Valores promedios ± desviación estándar acompañados por letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) entre las plantaciones de alto y bajo vigor (González-Pedraza *et al.*, 2014).

<sup>a,b</sup>Mean values ± standard deviation accompanied by different lowercase letters indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ) between plots of high and low vigor plants (González-Pedraza *et al.*, 2014).

el cual se basa en la digestión de la muestra en ácido sulfúrico concentrado y oxidación con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Fleck y Munro, 1965).

**Proceso de mineralización de nitrógeno**

El proceso de mineralización se realizó en condiciones controladas de laboratorio siguiendo la metodología propuesta por Stanford y Smith (1972). Para ello, de cada una de las muestras de suelo por lote de alto y bajo vigor, se pesaron 5 g de suelo a humedad de campo, sin tamizar y se colocaron en

and Smith (1972). For this, of each soil samples per lot of high and low vigor, 5 g of soil were weighed at field humidity, without sieving and were placed in 50 mL plastic centrifuge tubes. The initial inorganic N present in the soil samples was washing with 33.3 mL of a 0.01 M calcium chloride ( $CaCl_2$ ) solution. After the initial N extraction process, 5 mL of a N-free nutrient solution with the following concentrations was added to each tube:  $CaSO_4 \cdot 2H_2O$  0.002 M;  $MgSO_4$  0.002 M;  $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$

tubos plásticos de centrifuga de 50 mL. El N inorgánico inicial presente en las muestras fue eliminado mediante un lavado con 33,3 mL de una solución de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,01 M. Posterior al proceso de extracción inicial del N, se le agregó a cada tubo 5 mL de una solución nutritiva libre de N con las siguientes concentraciones:  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,002 M;  $\text{MgSO}_4$  0,002 M;  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,005 M y  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,0025 M, con la finalidad de asegurar los nutrientes necesarios para el mantenimiento de la actividad de las poblaciones microbianas (Stanford y Smith, 1972).

Cada tubo con las muestras de suelos fue cubierto con una película de papel parafilm (American National Can, Greenwich, CT) a la que se le hicieron pequeños orificios para permitir el intercambio de gases y mantener un sistema aerobio. Antes de colocar los tubos dentro de la incubadora, fueron pesados y posteriormente agitados durante 5 minutos para prevenir la sedimentación de las partículas, evitando así un posible efecto de endurecimiento de los suelos. Inmediatamente los tubos se colocaron en una incubadora a 35 °C, óptima para que el proceso de mineralización de nitrógeno. El control de peso de los suelos se realizó cada 3 días con el fin de reponer la humedad perdida durante el tiempo de incubación.

Al cabo de dos semanas de incubación se procedió a sacar los tubos de la incubadora para realizar la primera extracción del nitrógeno mineralizado (amonio y nitrato) usando para ello una solución de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M. Una vez realizada la

0.005 M y  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.0025 M, in order to ensure the necessary nutrients for the maintenance of the activity of microbial populations (Stanford and Smith, 1972).

Each tube with the soil samples was covered with parafilm paper (American National Can, Greenwich, CT) in which small holes were made to allow gas exchange and maintain an aerobic system. Before placing the tubes inside the incubator, they were weighed and subsequently shaken for 5 minutes to prevent the sedimentation of the soil particles, thus avoiding a possible hardening effect of the soils. The tubes were immediately placed in an incubator at 35°C, the optimum temperature for the nitrogen mineralization process. The soil weight control was carried out every 3 days in order to replace the moisture lost during the incubation time.

After two weeks of incubation, the tubes were removed from the incubator to carry out the first extraction of the mineralized nitrogen (ammonium and nitrate) using a solution of  $\text{CaCl}_2$  0.01 M. After the first nitrogen extraction to the soil samples, the nutritive solution was added again following the methodology described above, then the tubes were again covered with perforated parafilm paper and placed inside the incubator at the same temperature of 35 °C. Successive extractions were carried out every 2 weeks until week ten, following the same procedure previously described. According to Stanford and Smith (1972), this incubation time is sufficient for the N mineralization potential of soils occurs.

primera extracción a las muestras de suelo se le adicionó de nuevo la solución nutritiva siguiendo la metodología antes descrita, luego los tubos fueron nuevamente tapados con el papel parafilm perforado y colocados dentro de la incubadora a la misma temperatura de 35 °C. Se realizaron extracciones sucesivas, siguiendo el mismo procedimiento previamente descrito cada 2 semanas hasta la semana diez. Según Stanford y Smith (1972), ese tiempo de incubación es suficiente para que ocurra la mineralización potencial del N de los suelos.

#### **Determinación del N mineralizado como amonio ( $\text{N-NH}_4^+$ )**

Del extracto obtenido anteriormente se tomó 1 mL de cada muestra y se transfirió a un tubo de ensayo. Luego a cada tubo se le adicionó 5 mL de un reactivo preparado con una mezcla de 34 g de salicilato de sodio, 25 g de citrato de sodio, 25 g de tartrato de sodio y 0,12 g de nitroprusiato de sodio en 1 L de agua. Luego de 15 minutos se adicionaron 5 mL de un reactivo alcalino preparado con 30 g de hidróxido de sodio en 750 mL de agua destilada, 10 mL de una solución de hipoclorito de sodio y se aforó a un litro con agua destilada.

Finalmente, luego de mezclar bien las muestras y los reactivos, se dejó desarrollar completamente el color por una hora y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 655 nm. Los patrones se prepararon con una solución de sulfato de amonio con una concentración de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{N-NH}_4^+$ . La concentración de  $\text{N-NH}_4^+$  de las muestras y los blancos

#### **Determination of mineralized N as ammonium ( $\text{N-NH}_4^+$ )**

From the extract obtained above, 1 mL of each sample was transferred into a test tube. Then, to each tube, 5 mL of a reagent prepared with a mixture of 34 g of sodium salicylate, 25 g of sodium citrate, 25 g of sodium tartrate and 0.12 g of sodium nitroprusside in one liter of distilled water. After 15 minutes, 5 mL of an alkaline reagent prepared with 30 g of sodium hydroxide in 750 mL of distilled water, 10 mL of a sodium hypochlorite solution and it was made up to one liter with distilled water.

Finally, after the extracts and reagents were mixed, the color was allowed to develop completely for one hour and the absorbance was measured at a wavelength of 655 nm. The standards were prepared with an ammonium sulfate solution with a concentration of 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{N-NH}_4^+$ . Concentration of  $\text{N-NH}_4^+$  of the samples and blanks was obtained by plotting their absorbance value against the concentration of the standards and subtracting the mean of the blank from the sample. Then the mineralized ammonium was calculated as follows:

$$\text{N-NH}_4^+ (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ suelo}) = C \cdot V / W$$

Where:

C = concentration ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

V = volume of extract (mL)

W = weight of sample (g)

#### **Determination of mineralized nitrogen as nitrate ( $\text{N-NO}_3^-$ )**

$\text{N-NO}_3^-$  was determined in the same extracts obtained from the sample with the 0.01 M  $\text{CaCl}_2$  solution. 0.5 mL of the samples were placed into

se obtuvo graficando su valor de absorbancia contra la concentración de los patrones y restando la media del blanco de la muestra. Luego el amonio mineralizado se calculó de la siguiente forma:

$$N-NH_4^+ (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ suelo}) = C \cdot V / W$$

Donde:

C= concentración ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

V= volumen del extracto (mL)

W= peso de la muestra (g)

Determinación de nitrógeno mineralizado como nitrato ( $N-NO_3^-$ )

El  $N-NO_3^-$  se determinó en los mismos extractos obtenidos de la muestra con la solución de  $CaCl_2$  0,01 M. Se tomaron 0,5 mL de las muestras y se colocaron en tubos de ensayo a los cuales se les adicionó 1 mL de una solución de ácido salicílico (5 g de ácido salicílico mezclados con 95 mL de ácido sulfúrico concentrado), se mezcló bien y luego de 30 minutos se adicionaron 10 mL de una solución de hidróxido de sodio 4M. Se mezcló y se dejó desarrollar el color durante una hora. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 410 nm. Para construir la curva patrón se realizó el mismo procedimiento que aplicado a las muestras.

El patrón se preparó partiendo de una solución de nitrato de potasio ( $KNO_3$ ) con una concentración de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , de la cual se tomaron 0, 2, 4, 6, 8 y 10 mL y se colocaron en matraces volumétricos de 50 mL. El volumen se completó con la misma solución extractora de  $CaCl_2$  0,01 M. La concentración de  $N-NO_3^-$  se determinó graficando la absorbancia

test tubes to which 1 mL of a salicylic acid solution was added (5 g of salicylic acid mixed with 95 mL of concentrated sulfuric acid), it was mixed well and after 30 minutes 10 mL of a 4M sodium hydroxide solution were added. It was mixed and the color was allowed to develop for one hour. The absorbance was measured at a wavelength of 410 nm. To construct the standard curve, the same procedure as applied to the samples was carried out.

The standard was prepared starting from a solution of potassium nitrate ( $KNO_3$ ) with a concentration of  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , from which 0, 2, 4, 6, 8 and 10 mL were placed in volumetric flasks of 50 mL. The volume was completed with the same extracting solution of  $CaCl_2$  0.01 M. The concentration of  $N-NO_3^-$  was determined by plotting the absorbance of the standards against the respective concentration of each sample. Then the mineralized N as  $NO_3^-$  was calculated as follows:

$$N-NO_3^- (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) = C \cdot V / W$$

Where:

C = concentration ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

V = volume of extract (mL)

W = weight of sample (g)

### Kinetics of N mineralization

The net mineralization of N ( $N_m$ ), the potentially mineralizable organic N ( $N_0$ ) and the mineralization rate constant ( $k$ ) were calculated according to the methodology developed by Stanford and Smith (1972). The  $N_m$  was calculated as the sum of the  $N-NH_4^+$  y  $N-NO_3^-$  at each incubation interval. The accumulated net mineralization of N was linearly related to the square

de los patrones contra la respectiva concentración de cada muestra. Luego el N mineralizado como  $\text{NO}_3^-$  se calculó como sigue:

$$N\text{-NO}_3^- (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) = C \cdot V / W$$

Donde:

C= concentración ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

V= volumen del extracto (mL)

W= peso de la muestra (g)

### Cinética de la mineralización de N

Se calculó la mineralización neta de N ( $N_m$ ), el N orgánico potencialmente mineralizable ( $N_0$ ) y la constante de la tasa de mineralización ( $k$ ) de acuerdo con la metodología desarrollada por Stanford y Smith (1972). El  $N_m$  fue calculado como la suma del  $\text{N-NH}_4^+$  y  $\text{N-NO}_3^-$  en cada intervalo de incubación. La mineralización neta acumulada de N fue linealmente relacionada con la raíz cuadrada del tiempo, a través de las diez semanas de incubación. El  $N_0$  y la  $k$  para el período de incubación de siete semanas fueron obtenidos usando la ecuación propuesta por Stanford y Smith (1972):

$$N_m = N_0 (1 - e^{-kt})$$

Donde:

$N_m$  = cantidad de N mineralizado en un tiempo determinado ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )

$N_0$  = N potencialmente mineralizable ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )

$k$  = tasa constante de mineralización de primer orden (semanas<sup>-1</sup>)

$t$  = tiempo de incubación (semanas)

### Análisis estadístico

Se aplicó un análisis de la varianza

root of time, through the ten weeks of incubation.  $N_0$  and  $k$  for the seven-week incubation period were obtained using the equation proposed by Stanford and Smith (1972):

$$N_m = N_0 (1 - e^{-kt})$$

Where:

$N_m$  = amount of mineralized N in a given time ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )

$N_0$  = potentially mineralizable N ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )

$k$  = constant rate of first order mineralization (weeks<sup>-1</sup>)

$t$  = incubation time (weeks)

### Statistical analysis

A one-way analysis of variance (ANOVA) was applied based on compliance with the assumptions of normality, homogeneity of variance and independence of the samples, to the data of total nitrogen, mineralized nitrogen (ammonium and nitrate) during each incubation period (weeks 2, 4, 6, 8 and 10). When the ANOVA was significant ( $p < 0.05$ ), a Tukey test was applied for multiple comparisons of means with a probability of 95%. To relate variables in the sites of interest, a simple linear regression analysis was used, considering as dependent variables the parameters associated with the vigor of the plants and, independent variables total nitrogen, mineralized nitrogen (ammonium and nitrate) every two weeks, the parameters derived from the kinetics of N mineralization, namely mineralized nitrogen accumulated during the 10 weeks of incubation ( $N_m$ ), the constant rate of nitrogen mineralization ( $k$ ) and the potentially mineralizable



de una vía (ANOVA) tomando como base el cumplimiento de los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianza e independencia de las muestras, a los datos de nitrógeno total, nitrógeno mineralizado (amonio y nitrato) durante cada período de incubación (semanas 2, 4, 6, 8 y 10). Cuando el ANOVA resultó significativo ( $p < 0,05$ ), se aplicó una prueba de Tukey para comparaciones múltiples de medias con una probabilidad de 95 %. Para relacionar variables en los sitios de interés, se utilizó un análisis de regresión lineal simple considerando como variables dependientes los parámetros asociados al vigor de las plantas y variables independientes el nitrógeno total, el nitrógeno mineralizado (amonio y nitrato) cada dos semanas, los parámetros derivados a partir de la cinética de la mineralización de N, a saber nitrógeno mineralizado acumulado durante las 10 semanas de incubación (Nm), la tasa constante de mineralización de nitrógeno (K) y el nitrógeno potencialmente mineralizable (N0).

El análisis estadístico fue realizado utilizando el paquete estadístico STATISTICA para Windows 6.0 (STATISTICA, 2001).

## Resultados y discusión

### Nitrógeno total

El porcentaje de N total de los suelos no presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los lotes de alto y bajo vigor de las plantas de plátano (figura 1).

nitrógeno (N0). Statistical analysis was performed using the STATISTICA statistical package for Windows 6.0 (STATISTICA, 2001).

## Results and discussion

### Total nitrogen

The total N percentage of the soils did not present significant differences ( $p < 0.05$ ) between the high and low vigor plots of the plantain plants (figure 1).

These values are particularly low when compared with reference data for soils of alluvial origin and similar textural characteristics (Rodríguez *et al.*, 2004). It is probable that factors such as the percentage of relatively low organic carbon ( $1.8 \pm 0.52$  in soils with high vigor plants and  $2.5 \pm 0.48$  in soils with low vigor plants) coupled with pH ( $6.12 \pm 0.69$  and  $5.87 \pm 0.60$  in the high and low vigor plant plots, respectively) are affecting the concentration of N in these soils. Organic matter is the main source of N in soils and when it is low, microorganisms have little available substrate. Additionally, the microbial populations responsible for N mineralization are especially sensitive to low pH in soils.

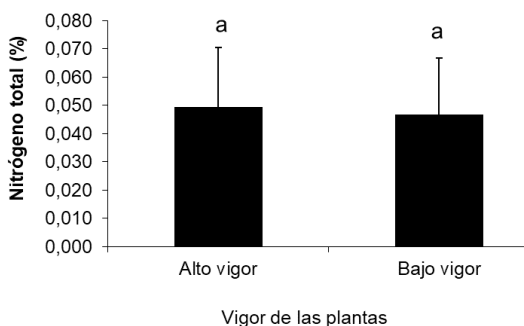
### N mineralization

The mineralized N during the 10 weeks that the experiment lasted was only statistically ( $p < 0.05$ ) different in the nitrate form and the highest value corresponded to the low vigor plots of the plants. The plots with high vigor of the plants did not present differences in the mineralized available ammonia (figure 2).



Estos valores son particularmente bajos cuando se comparan con datos de referencia para suelos de origen aluvial y características texturales similares (Rodríguez *et al.*, 2004). Es probable que factores como el porcentaje de carbono orgánico ( $1,8 \pm 0,52$  en los suelos con plantas de alto vigor y  $2,5 \pm 0,48$  en los suelos con plantas de bajo vigor) relativamente bajo, aunado al pH ( $6,12 \pm 0,69$  y  $5,87 \pm 0,60$  en los lotes de planta de alto y bajo vigor,

In the soils of the BV plots, the N mineralization process that was favored was nitrification. Additionally, it is pertinent to mention that in BV a significantly higher percentage of organic carbon was found (table 1), which may be being used by soil microorganisms for their metabolic processes, which would also explain the higher concentration of  $N-NO_3^-$  in these soils.



**Figura 1. Nitrógeno total (%) en suelos de lotes de plantas de plátano alto vigor y bajo vigor en la Unidad de Producción Agrícola Socialista Bicentenario ubicada en Pueblo Nuevo, municipio Francisco Javier Pulgar del estado Zulia, Venezuela. AV: Alto vigor; BV: Bajo vigor. Valor promedio±desviación estándar acompañados por letras minúsculas distintas señalan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre AV y BV.**

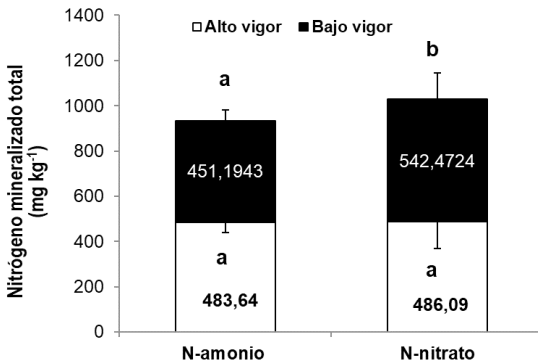
**Figure 1. Total nitrogen percentage in soils of plots of high vigor and low vigor plantain plants in the Bicentennial Socialist Agricultural Production Unit located in Pueblo Nuevo, Francisco Javier Pulgar municipality of Zulia state, Venezuela. AV: High vigor; BV: Low vigor. Mean value ± standard deviation accompanied by different lowercase letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between AV and BV.**

respectivamente) estén afectando la concentración de N en estos suelos. La materia orgánica es la principal fuente

On the other hand, these soils are heavily fertilized several times throughout the year with

de N de los suelos y cuando esta es baja los microorganismos tienen poco sustrato disponible. Adicionalmente, las poblaciones microbianas responsables de la mineralización del N son especialmente sensibles a el pH bajo en los suelos.

chemical sources, such as urea. In different studies, it has been shown that the application of fertilizers significantly affects the cycling of N in soils (Campos *et al.*, 2019; Dai *et al.*, 2017). In this respect, Dai *et al.* (2017) found that the long-term



**Figura 2.** Nitrógeno mineralizado como amonio y nitrato durante las 10 semanas de incubación en lotes de alto y bajo vigor de las plantas de plátano en la Unidad de Producción Agrícola Socialista Bicentenario ubicada en Pueblo Nuevo, municipio Francisco Javier Pulgar del estado Zulia, Venezuela. Valor promedio ± desviación estándar acompañados por letras minúsculas distintas señalan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre lotes de alto y bajo vigor.

**Figure 2.** Nitrogen mineralized as ammonium and nitrate during the 10 weeks of incubation in high and low vigor plots of plantain plants in the Bicentennial Socialist Agricultural Production Unit located in Pueblo Nuevo, Francisco Javier Pulgar municipality of Zulia state, Venezuela. AV: High vigor; BV: Low vigor. Mean value ± standard deviation accompanied by different lowercase letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between AV and BV.

**Mineralización de N**

El N mineralizado durante las 10 semanas que duró el experimento solamente resultó estadísticamente

application of nitrogen fertilizers did not significantly affect the crude ammonium immobilization rate, but did accelerate the nitrification

( $p < 0,05$ ) diferente en la forma de nitrato y el valor más alto correspondió a los lotes de bajo vigor de las plantas. Los lotes con alto vigor de las plantas no presentaron diferencias en el amonio disponible mineralizado (figura 2).

En los suelos de los lotes de BV el proceso de mineralización de N que se vio favorecido fue la nitrificación. Adicionalmente, es pertinente mencionar que en BV se encontró un porcentaje de carbono orgánico significativamente más alto (cuadro 1), el cual puede estar siendo usado por los microorganismos del suelo para sus procesos metabólicos, lo que explicaría también la mayor concentración de  $N-NO_3^-$  en estos suelos.

Por otro lado, estos suelos son fuertemente fertilizados varias veces al año con fuentes químicas, como la urea. En diferentes estudios se ha demostrado que la aplicación de fertilizantes afecta significativamente el ciclaje de N en los suelos (Campos *et al.*, 2019; Dai *et al.*, 2017). A este respecto, Dai *et al.* (2017), encontraron que la aplicación de fertilizantes nitrogenados a largo plazo no afectó significativamente la tasa bruta de inmovilización de amonio, pero si aceleró la tasa de nitrificación. Esto puede tener implicaciones importantes en las pérdidas potenciales de N como nitrato por lixiviación y escorrentía y afectar la fertilidad de los suelos.

En los suelos estudiados es posible que la aplicación de fertilizantes químicos proporcione el sustrato necesario para la nitrificación y aumente el tamaño y la actividad de las poblaciones bacterianas oxidantes de amoníaco en los suelos, especialmente los fertilizantes nitrógenos amoniacales.

This can have important implications in the potential losses of N as nitrate by leaching and runoff and affect the fertility of the soils.

In the soils studied, it is possible that the application of chemical fertilizers provides the necessary substrate for nitrification and increases the size and activity of the ammonia-oxidizing bacterial populations in the soils, especially ammoniacal nitrogen fertilizers.

In this regard, Mahal *et al.* (2019) pointed out that, the sources of ammonia fertilization in the corn crop had a suppressive effect on the mineralization rate of soil organic matter, demonstrating that the effect of nitrogen fertilizer on microbial activity could exceed the indirect effects of this through large changes in net primary productivity altering the contributions of organic matter, temperature and soil moisture content.

Additionally, the soil texture also affects the mineralization of N. In BV, the percentage of sand was significantly higher than in AV; therefore, it is possible that this characteristic is contributing to a greater mineralization of N in those soils (Cai *et al.*, 2016).

Nitrogen mineralization is also affected by soil temperature, humidity, and aeration. In the study area, high temperatures, as well as high rainfall, are contributing to the occurrence of a higher rate of mineralization of N in the soils of BV (Celaya-Michel and Castellanos-Villegas, 2011).

A este respecto, Mahal *et al.* (2019) señalaron que las fuentes de fertilización amoniacal en el cultivo de maíz tuvieron un efecto supresor sobre la tasa de mineralización de la materia orgánica del suelo, demostrando que el efecto del fertilizante nitrogenado sobre la actividad microbiana podría exceder los efectos indirectos de ésta a través de grandes cambios en la productividad primaria neta alterando los aportes de materia orgánica, la temperatura y contenido de humedad del suelo.

Adicionalmente, la textura del suelo también afecta la mineralización de N. En BV el porcentaje de arena resultó significativamente más alto que en AV, por lo tanto, es posible que tal característica esté contribuyendo a una mayor mineralización del N en esos suelos (Cai *et al.*, 2016).

La mineralización de nitrógeno también es afectada por la temperatura, humedad, y aireación del suelo. En la zona de estudio las altas temperaturas, así como las altas precipitaciones están contribuyendo a que ocurra una mayor tasa de mineralización de N en los suelos de BV (Celaya-Michel y Castellanos-Villegas, 2011).

### **Nitrógeno mineralizado acumulado (Nm)**

Solamente se observaron diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) en Nm a la semana 2 de incubación. La mineralización de N siguió un incremento exponencial y en la semana 10 todavía había una gran cantidad de N mineralizándose (cuadro 3).

A este respecto, Celaya-Michel y Castellanos-Villegas (2011) señalan que los microorganismos responden

### **Accumulated mineralized nitrogen (Nm)**

Only statistical differences ( $p < 0.05$ ) were observed in Nm at week 2 of incubation. N mineralization followed an exponential increase and at week 10 there was still a large amount of N mineralizing (table 3).

The significantly higher Nm value in BV could be due to the higher percentage of organic carbon found in these soils (table 2). Similarly, it is possible that microorganisms under the sandy soil conditions respond more quickly to the pulse of moisture and nutrients supplied at the beginning of the test. In this respect, Celaya-Michel and Castellanos-Villegas (2011) indicate that microorganisms respond quickly to the availability of moisture in the soil, even in the case only a small wet surface portion event.

The exponential mineralization of N in week 10 indicates that more time is required to 10 weeks for all N available in these soils are completely mineralize.

### **Kinetics of N mineralization**

The parameters obtained from the first-order equation proposed by Stanford and Smith (1972) are presented in table 4. According to these results, only statistical differences ( $p < 0.05$ ) were found in the constant rate of mineralization (k) between the high and low vigor plots, while the accumulated mineralized N (Nm) and the potentially mineralizable N (N0) during the 10 weeks of incubation did not show differences between plots.

The k value found in these soils (between 0.06 and 0.07) is lower than the data reported by Celaya-Michel

**Cuadro 3. Nitrógeno mineralizado acumulado durante las 10 semanas de incubación en los suelos de los lotes de plantas de plátano de alto y bajo vigor de la Unidad de Producción Agrícola Socialista Bicentenario ubicada en Pueblo Nuevo, municipio Francisco Javier Pulgar del estado Zulia, Venezuela.**

**Table 3. Mineralized nitrogen accumulated during the 10 weeks of incubation in the soils of the plots of high and low vigor plantain plants of the Bicentennial Socialist Agricultural Production Unit located in Pueblo Nuevo, Francisco Javier Pulgar municipality of Zulia state, Venezuela.**

Semana	Nitrógeno mineralizado acumulado (Nm, mg.kg <sup>-1</sup> )	
	Alto vigor	Bajo vigor
2	96,37±20,18 <sup>a</sup>	114,35±33,63 <sup>b</sup>
4	268,25±25,33 <sup>a</sup>	270,46±36,79 <sup>a</sup>
6	446,95±36,86 <sup>a</sup>	455,68±64,84 <sup>a</sup>
8	652,89±54,52 <sup>a</sup>	676,11±99,69 <sup>a</sup>
10	969,74±103,87 <sup>a</sup>	993,67±117,14 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> <sup>b</sup>Valor promedio ± desviación estándar acompañado por letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ) en el Nm entre las plantaciones de alto y bajo vigor.

<sup>a</sup> <sup>b</sup>Mean value ± standard deviation accompanied by different lowercase letters indicate statistical differences ( $p < 0.05$ ) in Nm between high and low vigor plantations.

rápida a la disponibilidad de humedad en el suelo, aún cuando se trate de un evento pequeño que solo humedezca la parte superficial.

La mineralización exponencial de N aún en la semana 10 indica que se requiere un tiempo mayor a 10 semanas para lograr que todo el N disponible en esos suelos se mineralice completamente.

El valor significativamente más alto de Nm en BV puede deberse al mayor porcentaje de carbono orgánico encontrado en esos suelos (cuadro 2). De igual forma, es posible que los microorganismos bajo las condiciones de suelo más arenoso respondan de forma más rápida al pulso de humedad

and Castellanos-Villegas (2011), for different types of forest vegetation and grasses. The value found is indicating that in the high vigor plots the model predicts that at 35 ° C it takes 16.66 weeks (1 / 0.06) for the N0 obtained to mineralize (1314.82 ± 283.14 mg.kg<sup>-1</sup>) at a rate of 6% N per week. On the other hand, in the low vigor plots, the model predicts that under the same conditions of the experiment the N0 obtained (1291.99 ± 312.24) would mineralize in 14.28 weeks (1 / 0.07) at a rate of 7% per week (table 4). The fact that N0 was higher than Nm confirms that a time of 10 weeks was not enough to reach the total mineralization of the N available in the soils. According to the

y nutrientes suministrado al inicio del ensayo.

**Cinética de la mineralización de N**

Los parámetros obtenidos de la ecuación de primer orden propuesto por Stanford y Smith (1972) son

calculation of the model, the incubation time should be 14 to 16 weeks.

It is important to note that, despite not finding statistical differences in N0 between plots, this parameter represents the amount of organic N in the

**Cuadro 4. Parámetros derivados a partir de la cinética de la mineralización de N aplicando la ecuación de primer orden:  $N_m = N_0 [1 - e^{-kt}]$  en suelos de lotes de plantas con alto y bajo vigor de la Unidad de Producción Agrícola Socialista Bicentenario ubicada en Pueblo Nuevo, municipio Francisco Javier Pulgar del estado Zulia, Venezuela.**

**Table 4. Parameters derived from the kinetics of N mineralization applying the first order equation:  $N_m = N_0 [1 - e^{-kt}]$  in soils of plots of plants with high and low vigor of the Production Unit Agrícola Socialista Bicentenario located in Pueblo Nuevo, Francisco Javier Pulgar municipality of Zulia state, Venezuela.**

Variable	Vigor de las plantas	
	Alto	Bajo
Nm	969,74±103,87 <sup>a</sup>	993,67±117,14 <sup>a</sup>
K	0,06±0,01 <sup>a</sup>	0,07±0,03 <sup>b</sup>
N <sub>0</sub>	1314,82±283,14 <sup>a</sup>	1291,99±312,24 <sup>a</sup>
R <sup>2</sup>	0,95	0,93

<sup>a,b</sup>Valor promedio ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticas (p < 0,05) entre los lotes. Nm= Nitrógeno mineralizado acumulado durante las 10 semanas de incubación (mg.kg<sup>-1</sup>). k= Tasa constante de mineralización de nitrógeno (1/semana). N0= Nitrógeno potencialmente mineralizable (mg.kg<sup>-1</sup>). R2= coeficiente de determinación del modelo.

<sup>a,b</sup>Mean value ± standard deviation. Different lowercase letters indicate statistical differences (p < 0.05) between plots. Nm = Mineralized nitrogen accumulated during the 10 weeks of incubation (mg.kg<sup>-1</sup>). k = Constant rate of nitrogen mineralization (1 / week). N0 = Potentially mineralizable nitrogen (mg.kg<sup>-1</sup>). R<sup>2</sup> = coefficient of determination of the model.

presentados en el cuadro 4. De acuerdo con esos resultados, solamente se encontraron diferencias estadísticas (p<0,05) en la tasa constante de mineralización (k) entre los lotes de alto y bajo vigor, mientras que el N mineralizado acumulado (Nm) y el N

soil that could be transformed into soluble inorganic forms, mainly ammonium and nitrate, through the heterotrophic aerobic microbial biomass (Ju and Zhang, 2017). Asimismo, constituye una manera eficaz

potencialmente mineralizable (N0) durante las 10 semanas de incubación no presentaron diferencias entre lotes.

El valor de  $k$  encontrado en estos suelos (entre 0,06 y 0,07) es más bajo que los datos reportados por Celaya-Michel y Castellanos-Villegas (2011), para diferentes tipos de vegetación de bosque y gramíneas. El valor encontrado está indicando que en los lotes de alto vigor el modelo predice que a 35 °C se requiere de 16,66 semanas (1/0,06) para que se mineralice el N0 obtenido ( $1314,82 \pm 283,14 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) a una tasa de 6 % de N por semana. Por su parte, en los lotes de bajo vigor el modelo predice que bajo las mismas condiciones del experimento el N0 obtenido ( $1291,99 \pm 312,24$ ) se mineralizaría en 14,28 semanas (1/0,07) a una tasa de 7 % por semana (cuadro 4). El que N0 resultara superior al Nm, confirma que un tiempo de 10 semanas no fue suficiente para alcanzar la mineralización total del N disponible en los suelos. Según el cálculo del modelo, el tiempo de incubación debió ser de 14 a 16 semanas.

Es importante señalar que, a pesar de no encontrarse diferencias estadísticas en N0 entre lotes, este parámetro representa la cantidad de N orgánico del suelo susceptible de ser transformada a formas inorgánicas solubles, principalmente amonio y nitrato, a través de la biomasa microbiana aerobia heterótrofa (Ju y Zhang, 2017). Asimismo, constituye una manera eficaz de cuantificar el aporte de N del suelo para las plantas y permite realizar recomendaciones sobre fertilización y estrategias de

de cuantificar el aporte de N del suelo para las plantas y permite realizar recomendaciones sobre fertilización y estrategias de manejo (Masunga *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017).

### **Relationship between the concentration of N in soils and the productivity parameters of plantain plants**

Due to the statistical differences found between the values of the parameters associated with productivity reported by González-Pedraza *et al.* (2014), a Pearson linear correlation analysis was applied in order to relate the concentration of N in the soils and the productivity of the plants and a positive correlation was found between the circumference of the pseudostem (cm), the number of hands per bunch and the height of the son (cm) with the mineralized ammonia (table 5).

In that sense, although the ammonium concentration was relatively low in relation to the nitrate, it is available form of nitrogen that was playing a preponderant role on the productivity parameters of the plants.

The mineralized N was above that reported for soils cultivated with Musaceae by Molero *et al.* (2008) in South of Lake Maracaibo ( $585 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). The process that was mainly favored in the soils of the low vigor plots was nitrification, which may be associated with the highest percentage of organic carbon and acid pH (<6.0). This behavior could also be explained by the higher sand content (51.15% in the low vigor plots versus



manejo (Masunga *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017).

**Relación entre la concentración de N en los suelos y los parámetros de productividad de las plantas de plátano**

Debido a las diferencias estadísticas encontradas entre los valores de los parámetros asociados a la productividad reportados por González-Pedraza *et al.* (2014), se procedió a aplicar un análisis de correlación lineal de Pearson con el fin de relacionar la concentración de N en los suelos y la productividad de las plantas y se encontró una correlación positiva entre la circunferencia del pseudotallo (cm), el número de manos por racimo y la altura del hijo (cm) con el amonio mineralizado (cuadro 5).

En ese sentido, aunque la concentración de amonio fue

29.13% in the high vigor plots), which allows better aeration which in turn favors the mineralization process of N in soils (table 1)

**Conclusions**

The mineralization of N differed between the analyzed soils, which had an impact on the productivity parameters of the plants. In the BV plant plots, the process that was favored was nitrification, which was associated with a higher percentage of organic carbon in the soil and a higher percentage of sand. Nitrogen input from soils can be quantified, but the incubation time of the samples should be prolonged under laboratory conditions.

*End of English Version*

**Cuadro 5. Correlación entre los parámetros de producción con la mineralización de nitrógeno en los suelos cultivados con plátano con alto y bajo vigor de las plantas en en la Unidad de Producción Agrícola Socialista Bicentenario ubicada en Pueblo Nuevo, municipio Francisco Javier Pulgar del estado Zulia, Venezuela.**

**Table 5. Correlation between the production parameters with the nitrogen mineralization in the soils cultivated with plantain with high and low vigor of the plants in the Bicentennial Socialist Agricultural Production Unit located in Pueblo Nuevo, Francisco Javier Pulgar municipality of Zulia state, Venezuela.**

Parámetros	r
Circunferencia pseudotallo (cm) vs Amonio mineralizado total	0,48
Número de manos por racimo vs Amonio mineralizado total	0,36
Altura del hijo (m) vs Amonio mineralizado total	0,40

r: Valor de correlación lineal simple de Pearson (p<0,05)

r: Value of simple linear correlation Pearson (p<0.05)

relativamente baja en relación con la de nitrato, es esta forma disponible de nitrógeno la que estaba jugando un papel preponderante sobre los parámetros de productividad de las plantas.

El N mineralizado estuvo por encima al reportado para suelos cultivados con Musáceas por Molero *et al.* (2008) en el Sur del Lago de Maracaibo (585 mg.kg<sup>-1</sup>). El proceso que principalmente se vio favorecido en los suelos de los lotes de bajo vigor fue la nitrificación, el cual puede estar asociado con el mayor porcentaje de carbono orgánico y el pH ácido (< 6,0). Este comportamiento también pudiera ser explicado por el mayor contenido de arena (51,15 % en los lotes de bajo vigor versus 29,13 % en los lotes de alto vigor), lo que permite una mejor aireación que a su vez favorece el proceso de mineralización de N en los suelos (cuadro 1).

## Conclusiones

La mineralización de N difirió entre los suelos analizados lo cual incidió en los parámetros de la productividad de las plantas. En los lotes de planta de BV el proceso que se vio favorecido fue la nitrificación que se asoció con un mayor porcentaje de carbono orgánico en el suelo y un mayor porcentaje de arena. Se puede cuantificar el aporte de nitrógeno de los suelos, pero se debe prolongar el tiempo de incubación de las muestras en condiciones de laboratorio.

## Literatura citada

- Aular, J. y M. Casares. 2011. Consideraciones sobre la producción de frutas en Venezuela. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, Volume Especial: 187-198.
- Cai, A., H. Xu, X. Shao, P. Zhu, W. Zhang, M. Xu and D. Murphy. 2016. Carbon and nitrogen mineralization in relation to soil particle-size fractions after 32 years of chemical and manure application in a continuous maize cropping system. PLoS ONE 11(3): e0152521. doi:10.1371/journal.pone.0152521.
- Campos, P.D.G., I. Alves, M. Mahmoud and M.X. Vieira. 2019. Potassium chloride: impacts on soil microbial activity and nitrogen mineralization. Cienc. Rural. 49(5): 1-9.
- Celaya-Michel, H. y E. Castellanos-Villegas. 2011. Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. Terra Lat. 29(3): 343-356.
- Dai, S., J. Wang, Y. Cheng, J. Zhang and Z. Cai. 2017. Effects of long-term fertilization on soil gross N transformation rates and their implications. J. Integr. Agric. 16(12): 2863-2870.
- Fleck, A. and H.N. Munro 1965. The determination of organic nitrogen in biological materials. Clin. Chim. Acta 2: 2-12.
- González-Pedraza, A.F., 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 las plantas. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 31(Sup. 1): 526-538.
- Gutiérrez, S.A. 2020. Economía y políticas agroalimentarias. Banco Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. 528 p.
- Gutiérrez, S.A. 2010. La Situación Agroalimentaria en Venezuela. Hacia una Nueva Estrategia. FORO. 3(5): 31-52.
- Herrera, C., LI. Calderón and A.M. Gutiérrez. 2017. Soil quality index



- in conventional and semi-ecological farms producing plantain (*Musa* AAB Simmonds cv. Dominic Harton) in Anolaima-Cundinamarca, Colombia. Acta Agron. 66(4): 457-465.
- Ju, X., and Ch. Zhang. 2017. Nitrogen cycling and environmental impacts in upland agricultural soils in North China: A review. J. Integr. Agric. 16(12): 2848-2862.
- Mahal, N.K., W.R. Osterholz, F.E. Miguez, H.J. Poffenbarger, J.E. Sawyer, D.C. Olk, S.V. Archontoulis and M.J. Castellano. 2019. Nitrogen fertilizer suppresses mineralization of soil organic matter in maize agroecosystems. Front. Ecol. Evol. 7:59.doi: 10.3389/fevo.2019.00059.
- Masunga, R.H., V. Nwakaego, P. Deusededit, M. Inakwu, A. Singhd, D. Buchane and S. De Nevee. 2016. Nitrogen mineralization dynamics of different valuable organic amendments commonly used in agriculture. Appl. Soil Ecol. 101: 185-193.
- Meya, A., P.A. Ndakidemi, K.M. Mtei, R. Swennen and R. Merckx. 2020. Optimizing soil fertility management strategies to enhance banana production in volcanic soils of the Northern Highlands, Tanzania. Agronomy. 10(289): 1-21. doi:10.3390/agronomy10020289.
- Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales Renovables (MARNR). 1978. Hacia un plan rector de ordenación del territorio. Zona Sur del Lago de Maracaibo. Serie informe
- Técnicos DGPOA/IT/16. Caracas, Venezuela. 78 pp.
- Molero, M., L. Gutiérrez, Q. Contreras, C. Rondón, P. Carrero y E. Rojas. 2008. Determinación de los niveles de: K, P, N, Ca, Mg, Zn, Cu, Fe, y Mn en muestras de suelos y tejido foliar del cultivo *Musa* AAB, subgrupo plátano cv. Hartón. Prod. Agrop. 1(1): 3-6.
- Otzen, T. y C. Manterola. 2017. Técnicas de muestreo sobre una población a estudio. Int. J. Morphol. 35(1): 227-232.
- 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.
- Rodríguez, V., E. Malavolta, A. Sánchez y O. Lavoranti. 2004. Balance nutricional de referencia de suelos y hojas en el cultivo de plátano Hartón. Bioagro. 16(1): 39-46.
- Stanford, G. and S.J. Smith. 1972. Nitrogen mineralization potentials of soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 36: 465-472.
- STATISTICA 2001. Basic Statistical Analysis Methods. Versión 6.0. StatSoft, Tulsa, OK.
- Wu, Y., M. Shaaban, C. Deng, Q. Peng and R. Hu. 2017. Changes in the soil N potential mineralization and nitrification in a rice paddy after 20 yr application of chemical fertilizers and organic matter. Can. J. Soil Sci. 97: 290-299.

## Evaluación de la sequía meteorológica en locaciones agrícolas de Venezuela bajo proyecciones futuras de cambio climático

Assessment of meteorological drought in agricultural locations from Venezuela under future projections of climate change

Avaliação da seca meteorológica em locais agrícolas na Venezuela sob projeções futuras de mudanças climáticas

Miguel I. Silva Borges\* y Naghely M. Mendoza D.

Departamento e Instituto de Ingeniería Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Av. Universidad, Maracay-Aragua, Venezuela. Correo electrónico: (MS) [miguel.i.silva@ucv.ve](mailto:miguel.i.silva@ucv.ve), ; (NM) [naghely.mendoza@ucv.ve](mailto:naghely.mendoza@ucv.ve), 

### Resumen

La sequía es un fenómeno con devastadoras consecuencias para los ecosistemas naturales, agrícolas y humanos. Para conocer los efectos a futuro, que pudiera tener el cambio climático sobre este fenómeno en ocho localidades agrícolas de Venezuela, se evaluaron los cambios en magnitud y duración de eventos de sequía meteorológica, de series de referencia y de series futuras (periodo 2050s), proyectadas por los modelos climáticos: NCAR-CCSM4, GISS-E2-R, NIMR-HADGEM2-AO y MPI-ESM-LR, bajo los escenarios RCP 2.6 y RCP 8.5. Los eventos de sequía se estimaron mediante el Índice de Precipitación Estandarizado (SPI) para la escala mensual, manteniendo los parámetros de forma y escala del periodo de referencia. Los resultados revelan una elevada variabilidad de los eventos de sequía entre estaciones, modelos y escenarios; pero con un aumento común de la magnitud y duración en los eventos de sequía para todos los modelos, principalmente bajo el escenario RCP 8.5. Para el modelo NCAR-CCSM4 habría el mayor aumento en las características analizadas, en contraste al modelo NIMR-HADGEM2-AO. Las localidades con sequías de mayor magnitud y duración serían, Barinitas y Pariaguán.

**Palabras claves:** sequía, cambio climático, modelos, periodo, clima.

Recibido el 11-06-2020 • Aceptado el 03-09-2020

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico [miguel.i.silva@ucv.ve](mailto:miguel.i.silva@ucv.ve)

## Abstract

Drought is a phenomenon that is difficult to detect and predict, and with devastating consequences for natural, agricultural and human ecosystems. In order to know the future effects that climate change could have on this phenomenon in eight agricultural localities of Venezuela, the changes in the magnitude and duration of meteorological drought events were evaluated, for the reference series and for future series (period 2050s), projected by NCAR-CCSM4, GISS-E2-R, NIMR-HADGEM2-AO and MPI-ESM-LR models, for RCP 2.6 and RCP 8.5 scenarios. Drought events were estimated using the Standardized Precipitation Index (SPI) for the monthly scale and keeping the shape and scale parameters of the reference period. The results reveal a high variability of drought events among stations, models and scenarios; but with a common increase of the magnitude and duration of drought events for all models, mainly under the RCP 8.5 scenario. For the NCAR-CCSM4 model, there would be the greatest increase in the analyzed characteristics, in contrast to the NIMR-HADGEM2-AO model. The localities with droughts of greater magnitude and duration would be Barinitas and Pariaguán.

**Key words:** drought, climate change, models, period, climate.

## Resumo

A seca é um fenômeno com conseqüências devastadoras para os ecossistemas naturais, agrícolas e humanos. Para conhecer os efeitos futuros que a mudança climática poderia ter sobre este fenômeno em oito localidades agrícolas da Venezuela, foram avaliadas as mudanças de magnitude e duração dos eventos meteorológicos da seca, das séries de referência e das séries futuras (período 2050), projetadas pelos modelos climáticos: NCAR-CCSM4, GISS-E2-R, NIMR-HADGEM2-AO e MPI-ESM-LR, sob os cenários RCP 2.6 e RCP 8.5. Os eventos de seca foram estimados usando o Índice Padronizado de Precipitação (SPI) para a escala mensal, mantendo os parâmetros de forma e escala do período de referência. Os resultados revelam uma alta variabilidade de eventos de seca entre estações, modelos e cenários; mas com um aumento comum na magnitude e duração dos eventos de seca para todos os modelos, principalmente sob o cenário RCP 8.5. Para o modelo NCAR-CCSM4 haveria o maior aumento nas características analisadas, em contraste com o modelo NIMR-HADGEM2-AO. As localidades com secas de maior magnitude e duração seriam, Barinitas e Pariaguán.

**Palavras-chave:** seca, mudança climática, modelos, período, clima.

## Introducción

El cambio climático es un fenómeno a escala mundial, cuyas consecuencias se pueden presentar en cualquier rincón del planeta. Tiene diferentes orígenes y es difícil de identificar. Sin embargo, eventos de baja probabilidad de ocurrencia, como los eventos extremos, en especial los eventos de sequía, han aumentado su frecuencia, y serán más numerosos a medida que se intensifique el cambio climático (OMM, 2016). Para el IPCC (2014) es probable que la frecuencia e intensidad de las sequías haya aumentado en el Mediterráneo y África occidental, y que haya disminuido en el área central de América del Norte y el noroeste de Australia. Los cambios futuros proyectados para las trayectorias de concentración representativas (RCP por sus siglas en inglés) indican que, a principios del siglo XXI, podrían producirse cambios en la humedad del suelo y, al final del siglo, dentro del marco del escenario RCP 8.5, estos cambios intensificarán la sequía agrícola en las regiones actualmente secas, a escala regional y mundial (IPCC, 2014).

Las proyecciones publicadas por el IPCC se ven limitadas por el uso de una escala demasiado gruesa, lo que dificulta su aplicación en estudios regionales y locales. Así mismo, no reportan información sobre la sequía en América Latina, para las proyecciones de escenarios de cambio climático, aun cuando el impacto de la sequía en esta región, es cada vez más importante. Según la FAO (2018), para el período comprendido entre

## Introduction

Climate change is a global phenomenon which consequences can occur in any corner of the planet. It has different origins and is difficult to identify. However, events with a low probability of occurrence, such as extreme events, especially drought events, have increased its frequency, and will be more numerous as climate change intensifies (WMO, 2016). For the IPCC (2014) it's probably that the frequency and intensity of droughts have increased in the Mediterranean and West Africa, but have decreased in central North America and northwestern Australia. The projected future changes for the representative concentration pathway (RCPs) indicates that changes in the soil moisture could produce at the early 21st century and by the end of it, within the framework of the scenario RCP 8.5. These changes will intensify agricultural drought for currently dry regions in a regional and global scale (IPCC, 2014).

The published projections by the IPCC are limited by the use of a too thick scale, which makes difficult to apply them on regional and local studies. Likewise, they do not report information about Latin America drought for the projections climate change of scenarios. Even though, the impact of the drought in this region is increasingly important. According to FAO (2018), for the period between 2005 and 2015, droughts caused agricultural losses equivalent to 13,000 million dollars in this region.

2005 y 2015, las sequías causaron pérdidas agrícolas equivalentes a 13.000 millones de dólares en esta región.

A pesar de que, en Venezuela, la evaluación de la sequía meteorológica ha sido ampliamente abordada (Mendoza y Puche, 2007; Paredes *et al.*, 2014; Olivares *et al.*, 2016; Olivares *et al.*, 2017; Paredes-Trejo y Olivares, 2018), en estudios de cambio climático, sólo se ha aplicado el índice de días consecutivos con precipitación menor a 1 mm y el de anomalías de la humedad del suelo, bajo los escenarios SRES A2 y modelos del CMIP3, para los períodos 2046–2065 y 2081–2100, cuyos resultados de anomalías de humedad del suelo en Venezuela fueron extremos (Marengo *et al.*, 2014). Sin embargo, esta investigación es poco detallada, y no reporta información sobre las áreas agrícolas más importantes del país.

Por otro lado, la definición de la sequía debe establecerse para cada ubicación, debido a lo impráctico de universalizar su definición (Lloyd-Hughes, 2014). El concepto más extendido define la sequía como una deficiencia de precipitación en relación con lo que se espera, y que se extiende durante un período de tiempo suficientemente largo, resultando en la incapacidad de satisfacer las demandas de las actividades humanas y el ambiente (Hayes *et al.*, 2011). No obstante, esta definición es muy conceptual y es esencial referirse a lo que es normal en cada localidad, en términos del suministro de lluvia para el cual se han desarrollado actividades productivas y de consumo.

Despite of the evaluation of the meteorological drought has been widely approached in Venezuela, (Mendoza & Puche, 2007; Paredes *et al.*, 2014; Olivares *et al.*, 2016; Olivares *et al.*, 2017; Paredes-Trejo & Olivares, 2018). In the climate change studies, only have been applied the index of consecutive days with precipitation less than 1 mm and the soil moisture anomalies index under the SRES A2 scenarios and CMIP3 models for the periods 2046 –2065 and 2081–2100. These results for soil moisture anomalies in Venezuela were extreme (Marengo *et al.*, 2014). However, this research is not very detailed, and does not report information on the most important agricultural areas of the country.

On the other hand, drought definition must be established for each location for the impracticality of universalizing its definition (Lloyd-Hughes, 2014). The most extended concept defines drought as a precipitation deficiency in relation to what is expected, and that extends over a sufficiently long time period, resulting in the inability to satisfy as human activities demands as environmental demands (Hayes *et al.*, 2011). However, this definition is very conceptual. It is essential to refer to what is normal in each locality in terms of the rain supply, for which productive and consumption activities have been developed.

An important aspect to consider is the assessment drought scale. The time scale which the precipitation deficiency accumulates is important, and functionally separates the



Además de esto, un aspecto importante a tener en cuenta es la escala de la evaluación de la sequía. La escala de tiempo durante la cual se acumula la deficiencia de precipitación es importante y separa funcionalmente los diferentes tipos de sequía (Mckee *et al.*, 1993). Gracias a que el SPI mensual refleja deficiencias de lluvia a corto plazo, está relacionado con tipos meteorológicos de sequía junto con la humedad del suelo y el estrés de los cultivos, lo que lo hace adecuado para evaluaciones de sequías agrícolas (OMM, 2012).

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es evaluar los eventos de sequía meteorológica, para la escala mensual, en localidades agrícolas de los llanos venezolanos empleando proyecciones futuras de cambio climático de acuerdo con 4 modelos de circulación general de la atmósfera regionalizados a 1 km<sup>2</sup> (Navarro-Racines *et al.*, 2020), que mejor se adaptan a la temperatura y precipitación de Venezuela (ACFIMAN-SACC, 2018), en comparación con los eventos de sequía calculados para un período de referencia (1950(69)-1998).

## Materiales y métodos

### Área de estudio

El área de estudio corresponde a la región de los llanos o sabanas venezolanas, ubicadas geográficamente entre las coordenadas 6° y 10° de latitud norte, y 62° y 72° de longitud oeste. Se compone de las sabanas occidentales, centrales y orientales. Presenta un clima

different types of drought (Mckee *et al.*, 1993). Moreover, the monthly SPI reflects short-term rainfall deficiencies and it is related to meteorological types of drought as well with soil moisture and crop stress, making it suitable for agricultural drought assessments (WMO, 2012).

The objective of this research is evaluate the meteorological drought events, in agricultural localities of the Venezuelan plains by a monthly scale, using future projections of climate change according to 4 general circulation models of the atmosphere regionalized in 1 km<sup>2</sup> (Navarro-Racines *et al.*, 2020), which are better adapted to the temperature and precipitation of Venezuela (ACFIMAN-SACC, 2018), compared to the drought events calculated for a reference period (1950 (69) -1998).

## Materials and methods

### Study area

The study area corresponds to Venezuelan plains or savannas, located between the coordinates 6 ° and 10 ° north latitude, and a west longitude within 62° and 72 °. Composed for western, central and eastern savannas. This region presents a predominant climate, defined according to Köppen, in tropical rainy savanna and tropical rainy forest at the west of the plains, with average temperatures between 19 to 26 ° C besides an average annual rainfall between 600 to 2200 mm and mainly seasonal rains (MARN, 2005). The topography ranges are from 20 to 600 meters above sea level with orographic formations that oscillate in

predominante, definido según Köppen, en tropical lluvioso de sabana y tropical lluvioso de bosque más al oeste de los llanos con temperaturas medias entre 19 a 26 °C, precipitación media anual entre 600 a 2200 mm y lluvias principalmente estacionales (MARN, 2005). La topografía oscila entre los 20 a 600 msnm con formaciones orográficas que varían en galeras, bancos, mesas y esteros. La figura 1 muestra el área de estudio y diferencia la ubicación de las diferentes sabanas en la región.

### Datos de precipitación

Para el período de referencia, se utilizaron los registros de precipitación mensual de 8 estaciones ubicadas en los llanos venezolanos (cuadro 1), cuyo registro abarca desde 1969 a 1998 en las estaciones Elorza y Hato Urañón y desde 1950 a 1998 para el resto. Los registros utilizados en esta investigación fueron sometidas a los criterios de control de calidad, basados en longitud y datos faltantes (menos de 15 % de datos faltantes), durante el estudio de las precipitaciones en Venezuela y su relación con el sistema climático (Martelo, 2003). Estas estaciones se encuentran en áreas de importante producción agrícola. Elorza, Hato Urañón, Pao-Oficina y Tinaquillo se encuentran en áreas donde predomina especialmente: caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), leguminosas (*Phaseolus vulgaris*), algodón (*Gossypium* sp.) y ganadería extensiva, mientras que Barinitas y Agua Blanca se destacan por su producción de arroz (*Oryza sativa*). En Pariaguán y Bergantín, predominan los cultivos de maíz (*Zea mays*), soja

galleys, benches, tables and estuaries. figure 1. Shows the study area and differentiates the location of the diverse savannas in the region.

### Precipitation data

The monthly precipitation records of 8 stations located in the Venezuelan plains were used for the reference period (table 1), whose record ranges are from 1969 to 1998 at the Elorza and Hato Urañón stations, and from 1950 to 1998 for the rest. The records used in this research were subjected to quality control criteria, based on length and missing data too (less than 15% of missing data), through the study of rainfall in Venezuela and its relationship with the climate system (Martelo, 2003). These stations are located in areas of important agricultural production. Elorza, Hato Urañón, Pao-Oficina and Tinaquillo are found in areas where sugar cane (*Saccharum officinarum*), legumes (*Phaseolus vulgaris*), cotton (*Gossypium* sp.) and extensive livestock are predominant, while Barinitas and Agua Blanca stand out for its production of rice (*Oryza sativa*). In Pariaguán and Bergantín, corn (*Zea mays*), soybean (*Glycine max*) and cotton (*Gossypium* sp) crops predominate.

The modeled series were generated by applying exchanges rates to the monthly precipitation series of the reference period. For the change rates estimation, the sheets of monthly average precipitation were used and downloaded from the website at the Investigation Program in the Consultative Group for International Agricultural Research (CGIAR) on

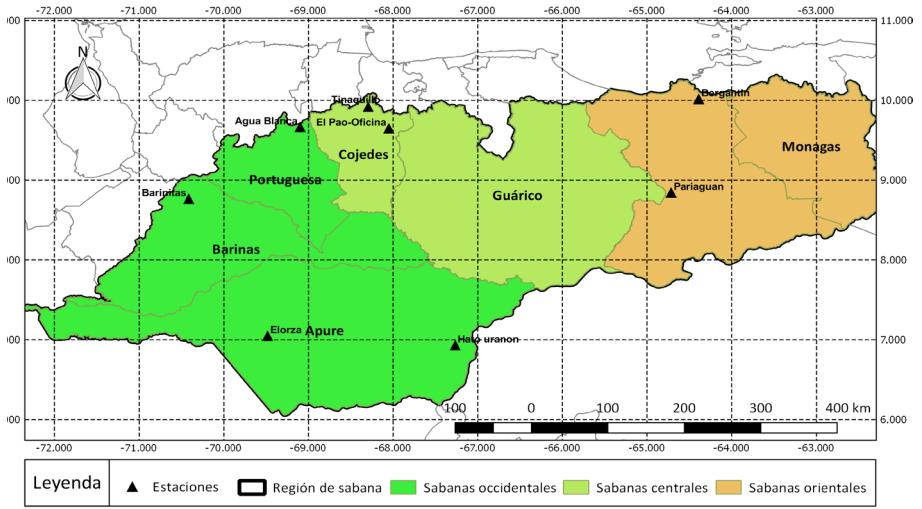


Figura 1. Diferenciación de las sabanas venezolanas y ubicación geográfica de las estaciones meteorológicas utilizadas en la investigación.

Figure 1. Venezuelan savannas differentiation and geographical location of the meteorological stations used in this research.

Cuadro 1. Datos de las estaciones meteorológicas seleccionadas para la investigación.

Table 1. Data from the meteorological stations selected for this research.

Estación	Serial	Registro	Estado	Longitud	Latitud	Alt. (msnm)
El Pao-Oficina	2349	1950-98	Cojedes	-68,050	9,650	128
Pariaguán	3712	1950-98	Anzoátegui	-64,716	8,845	240
Elorza	4291	1969-98	Apure	-69,483	7,050	90
Barinitas	3126	1950-98	Barinas	-70,413	8,767	550
Agua blanca	2239	1950-98	Portuguesa	-69,098	9,666	175
Bergantín	1796	1950-98	Anzoátegui	-64,389	10,017	310
Hato Urañón	5408	1969-98	Apure	-67,266	6,933	78
Tinaquillo	2316	1950-98	Cojedes	-68,293	9,921	385

Fuente: Martelo (2003).

Source: Martelo (2003).

(*Glycine max*) y algodón (*Gossypium* sp.).

Las series modeladas se generaron aplicando tasas de cambio a las series de precipitación mensual del periodo de referencia. Para la estimación de las tasas de cambio se utilizaron las láminas de precipitación promedio mensual descargadas del portal del Programa de Investigación del Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (CGIAR por sus siglas en inglés) sobre Cambio Climático, Agricultura y Seguridad Alimentaria (CCAFS) (<http://ccafs-climate.org/data/>) (Navarro-Racines *et al.*, 2020) de acuerdo con los modelos de Sistema Climático Comunitario (CCSM) del Centro Nacional de Investigación Atmosférica (NCAR): NCAR-CCSM4, el modelo de la NASA: GISS-E2-R, el modelo NIMR-HADGEM2-AO, y el modelo MPI-ESM-LR. Así mismo, se utilizó la base de datos del WorldClim v1.4 (<http://www.worldclim.org>) (Hijmans *et al.*, 2005), ya que fueron las bases de referencia que se emplearon para generar las superficies de alta resolución de los modelos de circulación general de la atmósfera para el proyecto del ccafs-climate (Navarro-Racines *et al.*, 2020).

Las tasas de cambio se extrajeron como el delta relativo entre las láminas de precipitación promedio mensual descargadas del ccafs-climate y de los valores de precipitación media mensual de los datos del WorldClim v1.4. Se seleccionó el período futuro 2050s, y dos escenarios, el RCP 2.6 y RCP 8.5. El delta relativo (DR) se calculó mediante la ecuación 1:

$$DR = \frac{VMCC - VMWC}{VMWC} \quad (1)$$

Climate Change, Agriculture and Food Security (CCAFS) (<http://ccafs-climate.org/data/>) (Navarro-Racines *et al.*, 2020) according to the following models of the Community Climate System Models (CCSM) of the National Center for Atmospheric Research (NCAR): NCAR-CCSM4, the NASA model: GISS-E2-R, the NIMR-HADGEM2-AO model, and the MPI-ESM-LR model. Likewise, WorldClim database v1.4 was used (<http://www.worldclim.org>) (Hijmans *et al.*, 2005), because was the reference selected to generate the high resolution surfaces of the atmosphere general circulation models for the ccafs-climate project (Navarro-Racines *et al.*, 2020). The change rates were extracted as the relative delta between the monthly average precipitation sheets downloaded from the ccafs-climate and the monthly average precipitation values from the WorldClim v1.4 data. The future period 2050s was selected, and the scenarios RCP 2.6 and RCP 8.5 were used. The relative delta (DR) was calculated through the equation 1:

$$DR = \frac{VMCC - VMWC}{VMWC} \quad (1)$$

Where DR is the relative delta, VMCC is the monthly ccafs-climate value and VMWC is the monthly WorldClim value. The deltas were applied to each months of the reference series equally, according to equation 2, to generate the modeled monthly precipitation:

$$PM = VMR + (DR * VMR) \quad (2)$$

Where PM is the modeled precipitation, VMR is the monthly value of the reference period and DR is

Donde DR es el delta relativo, VMCC es el valor mensual ccafs-climate y VMWC es el valor mensual WorldClim. Los deltas se aplicaron a cada uno de los meses de las series de referencia por igual según la ecuación 2, para generar la precipitación mensual modelada:

$$PM = VMR + (DR * VMR) \quad (2)$$

Donde PM es la precipitación modelada, VMR es el valor mensual del periodo de referencia y DR el delta relativo. Esta metodología es conocida como factor de cambio (Tabor y Williams, 2010), la cual, es una forma de corrección de sesgo que busca ajustar la media a largo plazo y la variabilidad de las simulaciones de los modelos de circulación general de la atmósfera.

Los RCP o en español, trayectorias de concentración representativas, son el último grupo de escenarios utilizados por el IPCC para la modelación climática futura (IPCC, 2014). Estos escenarios corresponden a trayectorias de emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) expresados en la cantidad de forzamiento radiativo total en vatios por metro cuadrado para el año 2100 y son el resultado de la colaboración entre modeladores de evaluación, modeladores climáticos y de ecosistemas terrestres y expertos en inventario de emisiones (van Vuuren *et al.*, 2011). Los RCP utilizados en esta investigación comprenden un escenario en el que los esfuerzos de mitigación conducen a un forzamiento de  $2,6 \text{ Wm}^{-2}$  (RCP 2.6) y un escenario con un nivel muy alto de emisiones de GEI, que genera un forzamiento de  $8,5 \text{ Wm}^{-2}$  (RCP 8.5).

the relative delta. This methodology is known as a change factor (Tabor and Williams, 2010), which is a form of bias correction that seeks to adjust the long-term mean and the simulations variability of the atmosphere general circulation models.

The Representative Concentration Pathway are the last group of scenarios used by the IPCC for future climate modeling (IPCC, 2014). These scenarios correspond to greenhouse gas (GHG) emission trajectories, expressed in the amount of total radiative forcing in Watts per  $\text{m}^2$  by the year 2100 and are the result of collaboration between assessment modelers, climate modelers, terrestrial ecosystems as well as experts in emissions inventory (van Vuuren *et al.*, 2011). The RCP used in this research comprise a scenario in which mitigation efforts lead to a forcing of  $2.6 \text{ Wm}^{-2}$  (RCP 2.6) and a scenario with a very high level of GHG emission, hence generates a forcing of  $8.5 \text{ Wm}^{-2}$  (RCP 8.5).

### **Estimation of the Standardized Precipitation Index (SPI)**

The SPI was calculated for series of the reference period and modeled series using a monthly scale. This index is based on the fit of the data distribution to a Gamma probability distribution. The parameters of the Gamma, alpha and beta probability distribution were calculated for each station, scale and month. The resulting parameters were used to calculate the cumulative probability of a precipitation event. This cumulative probability is given by equation 3:

Estimación del Índice de Precipitación Estandarizado (SPI)

El Índice de Precipitación Estandarizado (SPI) se calculó para las series del periodo referencia y series modeladas utilizando una escala mensual. Este índice se basa en el ajuste de la distribución de datos a una distribución de probabilidad Gamma. Se calcularon los parámetros de la distribución de probabilidad Gamma, alfa y beta para cada estación, escala y mes. Los parámetros resultantes se usaron para calcular la probabilidad acumulativa de un evento de precipitación. Esta probabilidad acumulada está dada por la ecuación 3:

$$G(x) = \int_0^x g(x) dx = \frac{1}{\beta^\alpha \Gamma(\alpha)} \int_0^x x^{\alpha-1} e^{-x/\beta} dx \quad (3)$$

Debido a que la función gamma no está definida para  $x = 0$ , como es frecuente en los datos de precipitación, la probabilidad acumulada viene dada por la ecuación 4:

$$H(x) = q + (1 - q)G(x) \quad (4)$$

Donde:  $H(x)$  es la probabilidad de tener una lámina de precipitación menor o igual a un valor de  $x$ ,  $G(x)$  es la función Gamma Incompleta y  $q$  es la probabilidad de no tener precipitación. Para Edwards y McKee (1997), se dice que tiene lugar un evento de sequía siempre y cuando el SPI presente una secuencia de valores negativos, tales que éstos sean iguales o inferiores a -1, y llega su fin hasta que dicho índice vuelve a tomar un valor positivo o cero.

$$G(x) = \int_0^x g(x) dx = \frac{1}{\beta^\alpha \Gamma(\alpha)} \int_0^x x^{\alpha-1} e^{-x/\beta} dx \quad (3)$$

Since the gamma function is not defined for  $x = 0$ , as is common in precipitation data, the cumulative probability is given by equation 4:

$$H(x) = q + (1 - q)G(x) \quad (4)$$

Where:  $H(x)$  is the probability of having a precipitation sheet less than or equal to a value of  $x$ ;  $G(x)$  is the Incomplete Gamma function and  $q$  is the probability of not having precipitation. For Edwards and McKee (1997), a drought event occurs as long as the SPI presents a sequence of negative values, such that these are equal to or less than -1, and ends until the index returns to take a positive value or zero.

The preliminary results of the estimation of the SPI shown that there was no variation in the value of the SPI in the modeled series when is compared with the series of the reference period. Therefore, both results were in agreement because the projected changes in the precipitation series were assumed to be normal for the future. Thus it was decided to keep the same values of the parameters of shape ( $\alpha$ ) and scale ( $\beta$ ) of the reference series to compare the variations of the modeled series with respect to the reference series.

### Drought Assessment

Was carried out taking into account the magnitude and duration of the calculated events. The magnitude of a drought event, according to McKee (1993), refers to the sum of the absolute values of the SPI, during the months that the event lasted (equation 5):

Al observar en los resultados preliminares de la estimación del SPI se pudo constatar que no existía variación del valor del SPI en las series modeladas al compararlas con las series del periodo de referencia. Se dedujo que ambos resultados coincidían debido a que los cambios proyectados en las series de precipitación se asumían como la normalidad para el futuro. Por lo que, se decidió conservar los mismos valores de los parámetros de forma ( $\alpha$ ) y escala ( $\beta$ ) de la serie de referencia para comparar las variaciones de las series modeladas respecto a las series de referencia.

### Evaluación de la Sequía

La evaluación de la sequía se realizó a partir de la magnitud y la duración de los eventos calculados. La magnitud de un evento de sequía, según Mckee (1993), se refiere a la sumatoria de los valores absolutos del SPI durante los meses que duró el evento (ecuación 5):

$$MS = -\left(\sum_{j=1}^n SPI_j\right) \quad (5)$$

Donde:  $n$  es el número de meses de duración del evento de sequía y  $SPI_j$  es el valor del índice SPI para el “j-esimo” mes del evento.  $MS$  es un valor adimensional y da una idea de la intensidad de sequía que tiene el evento (Mckee, 1993). Por lo tanto, pueden considerarse eventos equivalentes aquellos que tengan la misma magnitud. Aunque, según McKee (1993) la magnitud de un evento puede interpretarse como la cantidad

$$MS = -\left(\sum_{j=1}^n SPI_j\right) \quad (5)$$

Where:

$n$ : Months number duration of the drought event.

$SPI_j$ : SPI index value for the “j-th” month of the event.

$MS$ : A dimensionless value.

The  $MS$  value gives an idea of the drought intensity that the event has (Mckee, 1993). Therefore, equivalent events can be considered those that have the same magnitude. Although, according to McKee (1993) the magnitude of an event can be interpreted as the number of months with SPI of -1. In this research, the magnitude and duration were studied separately, since it is considered that the impact generated by an event, with for example a 16 magnitude and a duration of two months, is different from the impact of an event with a duration of 16 months and a value of SPI -1. For each station, once the events were defined, their magnitude and duration were calculated. Due to the variability of the values of the magnitudes in the results, it was decided to classify them into eight categories. From the results, the maximum magnitudes and durations, besides the events number of a particular magnitude and duration, were extracted.

## Results and discussion

### Drought events

In relation to events total number (figure 2) all models present a greater events number compared to the reference period, under both RCP



de meses con SPI de -1, en este trabajo se estudiaron la magnitud y duración por separado, ya que se considera que el impacto que genera un evento, cuya magnitud sea por ejemplo 16, y dure dos meses, es diferente al impacto de un evento que dure 16 meses con un valor del SPI -1. Para cada estación, una vez definidos los eventos, se calculó su magnitud y duración. Debido a la variabilidad de los valores de las magnitudes en los resultados, se decidió clasificarlos en ocho categorías. De los resultados, se extrajeron las magnitudes y duraciones máximas, y el número de eventos de magnitud y duración particulares.

## Resultados y discusión

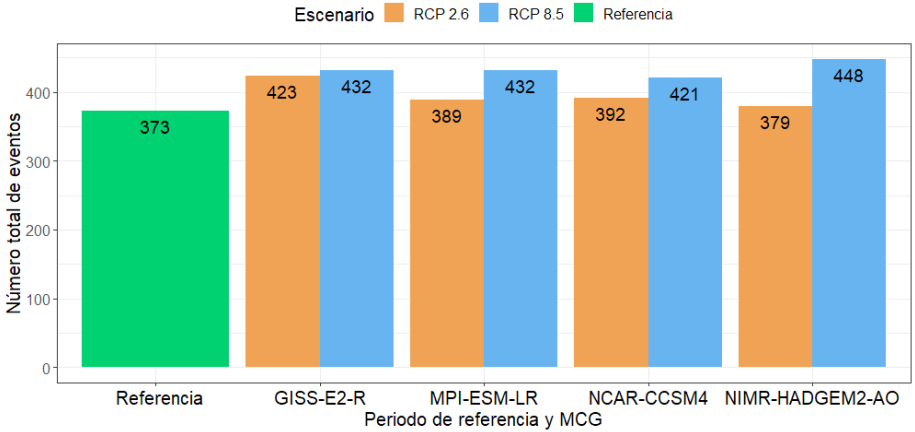
### Eventos de sequía

En relación con la cantidad total de eventos (figura 2), bajo ambos escenarios RCP, en todos los modelos presentan una mayor cantidad de eventos en comparación al periodo de referencia. Para el modelo NIMR-HADGEM2-AO y RCP 2.6, el número total de eventos sería muy similar al periodo de referencia; sin embargo, el RCP 8.5, bajo el mismo modelo, presentaría la mayor cantidad de eventos de todos los modelos y escenarios analizados. El modelo NIMR-HADGEM2-AO es el que presenta mayor diferencia en la cantidad de eventos de sequía previstos en los dos escenarios mientras que el modelo GISS-E2-R presenta la menor diferencia entre escenarios.

scenarios. For the NIMR-HADGEM2-AO and RCP 2.6 model, the events total number would be very similar to the reference period; However, the RCP 8.5, would show the highest events number of all the models and scenarios analyzed, under the same model. The NIMR-HADGEM2-AO model is the one that have the greatest difference in the drought events number predicted in the two scenarios, and the GISS-E2-R model presents the smallest difference between scenarios.

### Drought events magnitude

The figure 3 shows, that the drought events magnitude values distributions would vary in each locality in a differently under each model and scenario studied. Regarding the events maximum magnitudes, the most of the stations would present an increase compared to the reference period, for both RCP according to the four models, being the MPI-ESM-LR model the one that presents the smaller values events magnitude. When the events magnitudes distribution of the reference period, is compared with the events distribution of the MPI-ESM-LR model, great similarity is observed for almost all the stations, for both scenarios. The interquartile ranges are quite similar, with the exception of the Tinaquillo and Pariaguán stations, which indicate a large difference between the RCP 8.5 and the reference, presenting a 25% of events with magnitudes higher than those of the reference period. The GISS-E2-R, NCAR-CCSM4 and NIMR-HADGEM2-AO models have fairly similar distributions between



**Figura 2. Número total de eventos de sequía para el periodo de referencia (1950(69)-1998), modelos: GISS-E2-R, MPI-ESM-LR, NCAR-CCSM4 y NIMR-HADGEM2-AO, y escenarios: RCP 2.6 y RCP 8.5.**

**Figure 2. Events total number of drought for the reference period (1950 (69) -1998). Models: GISS-E2-R, MPI-ESM-LR, NCAR-CCSM4 and NIMR-HADGEM2-AO. Scenarios: RCP 2.6 and RCP 8.5.**

**Magnitud de los eventos de sequía**

Como puede observarse en la figura 3, las distribuciones de los valores de magnitud de los eventos de sequía variarían en cada localidad de forma distinta bajo cada modelo y escenario estudiado. Con relación a las magnitudes máximas de los eventos, la mayoría de las estaciones presentarían un aumento en comparación con el periodo de referencia, para ambos RCP de acuerdo con los cuatro modelos, siendo el modelo MPI-ESM-LR el que presenta los valores de magnitud de eventos más pequeños. Al comparar la distribución de las magnitudes de los eventos del período de referencia con la distribución de los eventos del modelo

them. The RCP 8.5 is the one with the highest maximum magnitudes for most models.

The maximum magnitudes would be showed for the GISS-E2-R model, under RCP 8.5 and in almost all stations, with the exception of Elorza and Bergantín. In the case of Elorza, the highest maximum magnitude would be presented for the NIR-HADGEM2-AO model, while Bergantín would had the highest maximum magnitude for the NCAR-CCSM4 model. The maximum magnitudes would range from 5.3 for the MPI-ESM-LR model (RCP 2.6 in Hato Urañón) and up to 16.8 for the GISS-E2-R model (RCP 8.5 in Agua Blanca). Regarding the events number,

MPI-ESM-LR, para ambos escenarios, se observa gran similitud para casi todas las estaciones, siendo los rangos intercuartiles bastantes similares, con la excepción de las estaciones Tinaquillo y Pariaguán, las cuales presentan una gran diferencia entre el RCP 8.5 y el de referencia, presentando un 25% de eventos con magnitudes superiores a las del periodo de referencia. Los modelos GISS-E2-R, NCAR-CCSM4 y NIMR-HADGEM2-AO presentan distribuciones bastante parecidas entre ellos. El RCP 8.5, es el que mayores magnitudes máximas presentaría para la mayoría de los modelos.

the figure 4 shows the total number of drought events for each magnitudes category according to each model studied. It can be seen, how when the magnitude increases, the number of recorded events decreases as for the reference period as for both scenarios. Three models showed great variability in the events number compared to the reference period. However, the MPI-ESM-LR model shows less variability in the events number with respect to the reference period, for each category and scenario.

In the case of events with magnitudes less than two (Mag <2),

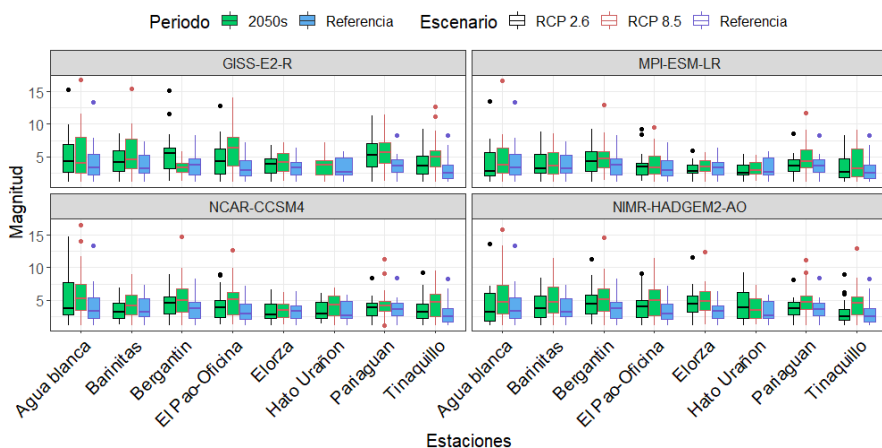


Figura 3. Distribución y valores máximos y mínimos de las magnitudes por cada estación meteorológica, periodos: referencia (1950-1998) y 2050s, modelos: GISS-E2-R, MPI-ESM-LR, NCAR-CCSM4 y NIMR-HADGEM2-AO, y escenarios: RCP 2.6 y RCP 8.5.

Figure 3. Distribution and maximum and minimum values of magnitudes for each meteorological station. Periods: Reference (1950-1998) and 2050s. Models: GISS-E2-R, MPI-ESM-LR, NCAR-CCSM4 and NIMR-HADGEM2-AO. Scenarios: RCP 2.6

Las magnitudes máximas se presentarían para el modelo GISS-E2-R bajo el RCP 8.5 y en casi todas las estaciones, a excepción de Elorza y Bergantín. Para el caso de Elorza, la mayor magnitud máxima se presentaría para el modelo NIR-HADGEM2-AO mientras que en Bergantín presentaría la mayor magnitud máxima para el modelo NCAR-CCSM4. Las magnitudes máximas oscilarían entre 5.3, para el modelo MPI-ESM-LR (RCP 2.6 en Hato Urañón) y hasta 16.8 para el modelo GISS-E2-R (RCP 8.5 en Agua Blanca). Con respecto al número de eventos, la figura 4 muestra el número total de eventos de sequía para cada categoría de magnitudes según cada modelo estudiado. Se puede ver que a medida que aumenta la magnitud del evento, el número de eventos registrados disminuye, tanto para el período de referencia como para ambos escenarios. Tres modelos mostraron una gran variabilidad en el número de eventos en comparación con el período de referencia. Sin embargo, el modelo MPI-ESM-LR muestra menos variabilidad en el número de eventos, para cada categoría y escenario, con respecto al período de referencia.

En el caso de eventos con magnitudes menores a dos ( $\text{Mag} < 2$ ), el periodo de referencia supera a ambos RCP, en todos los modelos estudiados, con un total de 148 eventos. El modelo MPI-ESM-LR es el que presenta una cantidad de eventos similar al periodo de referencia para el RCP 2.6, mientras que presenta 132 eventos para el RCP 8.5. Esta diferencia es mucho más grande en el resto de los

the reference period exceeds both RCP, with a total of 148 events, in all the models studied. The MPI-ESM-LR model is the one that shows a number of events similar to the reference period for RCP 2.6, while it presents 132 events for RCP 8.5. This difference is greater in the rest of the models, where only 82 events of this type were reached in the RCP 8.5 for the GISS-E2-R model. In this category ( $1 \leq \text{Mag} < 2$ ), a greater events number of these magnitudes, occur in RCP 2.6 compared to RCP 8.5 in all models. For events with magnitudes between two and three ( $2 \leq \text{Mag} < 3$ ), the reference period presents more events than those presented by the GISS-E2-R and NIMR-HADGEM2-AO models for both scenarios, while the models MPI-ESM-LR and NCAR-CCSM4 present a higher events number compared to the reference period, in RCP 8.5 and RCP 2.6 respectively. However, for the category ( $2 \leq \text{Mag} < 3$ ) there is very little variation between the reference period and the scenarios analyzed.

For magnitudes greater than three the events number is greater for both scenarios, than the events number in the reference period, in three of the four models. However, this is not the case in the MPI-ESM-LR model, where this period shows a greater events number of magnitudes between four and six (categories  $4 \leq \text{Mag} < 5$  and  $5 \leq \text{Mag} < 6$ ), than RCP 2.6. To compared RCP 2.6 with RCP 8.5 it can be observe that RCP 8.5 presents a greater events number than RCP 2.6, in all models, for categories with magnitudes greater than four. The largest differences, between scenarios,

modelos, llegando a presentarse solo 82 eventos de este tipo en el RCP 8.5 para el modelo GISS-E2-R. En esta categoría ( $1 \leq \text{Mag} < 2$ ), se presentan una mayor cantidad de eventos, de estas magnitudes, en el RCP 2.6 con respecto al RCP 8.5 en todos los modelos. En el caso de eventos con magnitudes entre dos y tres ( $2 \leq \text{Mag} < 3$ ) el período de referencia presenta más eventos que los presentados por los modelos GISS-E2-R y NIMR-HADGEM2-AO para ambos escenarios, mientras que los modelos MPI-ESM-LR y NCAR-CCSM4 presentan un mayor número de eventos, respecto al periodo de referencia, en el RCP 8.5 y RCP 2.6 respectivamente. No obstante, para la categoría ( $2 \leq \text{Mag} < 3$ ) hay muy poca variación entre el periodo de referencia y los escenarios analizados.

are presented in the NCAR-CCSM4 model and category  $5 \leq \text{Mag} < 6$ ; and in the NIMR-HADGEM2-AO model and category  $6 \leq \text{Mag} < 8$ .

**Drought events duration**

According to figure 5, the drought events durations show a marked variation between models and scenarios studied for different seasons. While, for the GISS-E2-R and NCAR-CCSM4 models there would be an increase in the maximum value and the IQR (Inter-Quartile Range), associated with the drought events durations, in almost all seasons for both RCP. In the case of MPI-ESM-LR and NIMR-HADGEM2-AO models, the changes in the maximum values and the IQR (Inter Quartile Range) in the durations compared to the reference period would be less

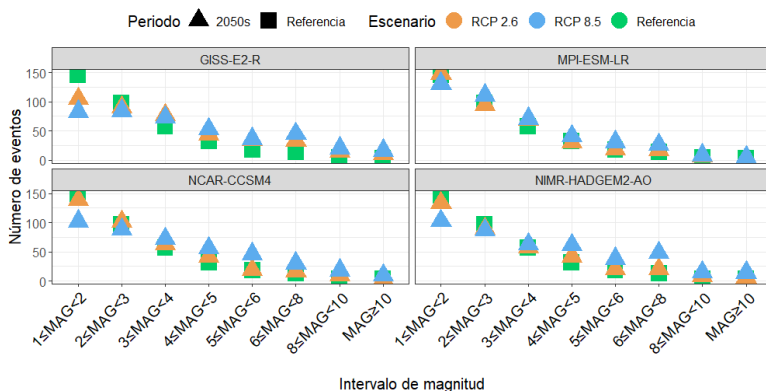


Figura 4. Número de eventos totales para todas las estaciones por cada intervalo de magnitudes, periodos: referencia (1950(69)-1998) y 2050s, modelos: GISS-E2-R, MPI-ESM-LR, NCAR-CCSM4 y NIMR-HADGEM2-AO, y escenarios: RCP 2.6 y RCP 8.5.

Figure 4. Events total number for all stations in each magnitude interval. Periods: Reference (1950 (69) -1998) and 2050s. Models: GISS-E2-R, MPI-ESM-LR, NCAR-CCSM4 and NIMR -HADGEM2-AO. Scenarios: RCP 2.6 and RCP 8.5.

Para magnitudes superiores a tres se tiene que, en tres de los cuatro modelos, el número de eventos es mayor, para ambos escenarios, que el número de eventos del periodo de referencia; esto no ocurre así en el modelo MPI-ESM-LR, donde este periodo muestra una mayor cantidad de eventos, de magnitudes entre cuatro y seis (categorías  $4 \leq \text{Mag} < 5$  y  $5 \leq \text{Mag} < 6$ ), que el RCP 2.6. Al comparar el RCP 2.6 con el RCP 8.5 se observa que el RCP 8.5 presenta, en todos los modelos, una mayor cantidad de eventos que el RCP 2.6 para las categorías con magnitudes mayores a cuatro. Las diferencias más grandes, entre escenarios, se presentan en el modelo NCAR-CCSM4 y categoría  $5 \leq \text{Mag} < 6$ ; y en el modelo NIMR-HADGEM2-AO y categoría  $6 \leq \text{Mag} < 8$ .

#### **Duración de los eventos de sequía**

De acuerdo con la figura 5, las duraciones de los eventos de sequía muestran una marcada variación entre los modelos y escenarios estudiados para las distintas estaciones. Mientras que para los modelos GISS-E2-R y NCAR-CCSM4 habría un incremento en el valor máximo y el IQR (Rango Inter Cuartil), asociados a las duraciones de los eventos de sequía, en casi todas las estaciones y para ambos RCP; para los modelos MPI-ESM-LR y NIMR-HADGEM2-AO, los cambios en los valores máximos y el IQR (Rango Inter Cuartil) en las duraciones en comparación al periodo de referencia serían menos evidentes, presentando estaciones en las que habría un aumento en los mismos, y otras estaciones presentan

evident, presenting stations in which there would be an increase in them, and other stations show a decrease. The Agua Blanca, Barinitas and Pao-Oficina stations are the only stations that show an increase both in the maximum duration of events and in the IQR for the four models studied.

The longest events would occur under the GISS-E2-R model, specifically in Hato Urañón and Agua Blanca. In Hato Urañón, an 18-month event would be presented under RCP 8.5, before a 16-month event in Agua Blanca under RCP 2.6.

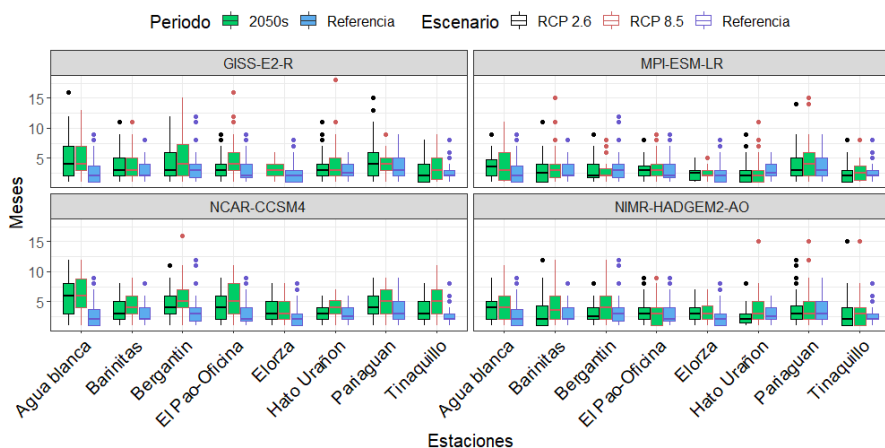
The NCAR-CCSM4 model presents maximum events durations shorter than those reported by the rest of the models. The most marked decrease in the durations of drought events would occur in the Hato Urañón and Bergantín stations, for the MPI-ESM-LR model in both scenarios, where 50% of the events durations would be less than the recorded durations in the reference period.

The events total number of drought as a function of the event duration, for each of the models and RCP, are shown in figure 6. It can be observing that, for all the models, there would be a decrease in the events number when increasing their duration, as well as it was registered in the reference period. Likewise, the largest events number would be concentrated in durations less than 6 months in all models and scenarios. The model that would experience the least changes in the distribution of events, depending on their duration, would be the MPI-ESM-LR.

una disminución. Las estaciones Agua Blanca, Barinitas y Pao-Oficina son las únicas estaciones que presentan un aumento tanto en la duración máxima de los eventos como en el IQR para los cuatro modelos estudiados.

Los eventos de mayor duración ocurrirían bajo el modelo GISS-E2-R, específicamente en Hato Urañón y Agua blanca. En Hato Urañón se presentaría un evento de 18 meses bajo el RCP 8.5, por delante de un evento de 16 meses en Agua blanca bajo el RCP 2.6.

Under RCP 2.6 there would be fewer changes in the events number of a particular duration compared to the reference period; On the other hand, for RCP 8.5 a decrease is observed in the events number lasting one or two months, with respect to the reference period and RCP 2.6. Additionally, for RCP 8.5, a significant increase is shown in the extreme events number, lasting longer than twelve months. On the other hand, figure 7 shows the stations that would present the most extreme events (those events of



**Figura 5. Distribución y valores máximos y mínimos de las duraciones de los eventos de sequía para los periodos: referencia (1950(69)-1998) y 2050s, modelos: GISS-E2-R, MPI-ESM-LR, NCAR-CCSM4 y NIMR-HADGEM2-AO, y escenarios: RCP 2.6 y RCP 8.5.**

**Figure 5. Distribution and maximum and minimum values of the drought events durations for the periods: Reference (1950 (69) -1998) and 2050s. Models: GISS-E2-R, MPI-ESM-LR, NCAR-CCSM4 and NIMR-HADGEM2-AO. Scenarios: RCP 2.6 and RCP 8.5.**

El modelo NCAR-CCSM4 presenta unas duraciones máximas de los eventos que son menores a las

greater magnitude and duration) for each model and scenario. In the four models, events with durations starting



reportadas por el resto de los modelos. La disminución más marcada en las duraciones de los eventos de sequía se presentaría en las estaciones Hato Urañón y Bergantín, para el modelo MPI-ESM-LR en ambos escenarios, donde el 50 % de las duraciones de los eventos serían menores a las duraciones registradas en el periodo de referencia.

El número total de eventos de sequía en función de la duración del evento, para cada uno de los modelos y RCP, se muestran en la figura 6. Puede observarse que, para todos los modelos, habría una disminución en la cantidad de eventos al aumentar la duración de los mismos, tal como se registró en el periodo de referencia. Así mismo, la mayor cantidad de eventos se concentrarían en las duraciones menores a 6 meses en todos los modelos y escenarios. El modelo que menos cambios experimentaría en la distribución de los eventos, en función de su duración, sería el MPI-ESM-LR.

Bajo el RCP 2.6 se registrarían menos cambios en el número de eventos, de una duración particular, en comparación al periodo de referencia; por otra parte, para el RCP 8.5, se observa una disminución en el número de eventos de uno o dos meses de duración, respecto al periodo de referencia y del RCP 2.6. Adicionalmente, para el RCP 8.5, se observa un aumento importante en el número de eventos extremos, con duraciones superiores a los doce meses.

Por otro lado, la figura 7 muestra las estaciones que presentarían los eventos más extremos (aquellos

at 9 months and with a magnitude greater than nine ( $> 9$ ) would be recorded. The GISS-E2-R, MPI-ESM-LR and NIMR-HADGEM2-AO models would agree that the Barinitas station could present an event with a magnitude greater than 13 ( $> 13$ ) and over a duration of 9 months. For the MPI-ESM-LR model, this event could last up to 15 months and present a magnitude of 16.5. Moreover, Hato Urañón would register the event with the longest duration, 18 months, and magnitude 12.8 under the GISS-E2-R model.

The increase in the drought events number presented by the four models, compared to the reference period, has already been occurring in this region of the country, as reported in other investigations (Olivares & Zingaretti, 2019). Since 2000, a large part of the Venezuelan territory has been affected by increasingly long-lasting and periodic droughts (Blunden & Arndt, 2015; Parra *et al.*, 2018); As well as, an increase in the occurrence frequency of very extreme dry periods (Paredes *et al.*, 2014; Olivares *et al.*, 2016). For both RCP, this pattern could become intensified.

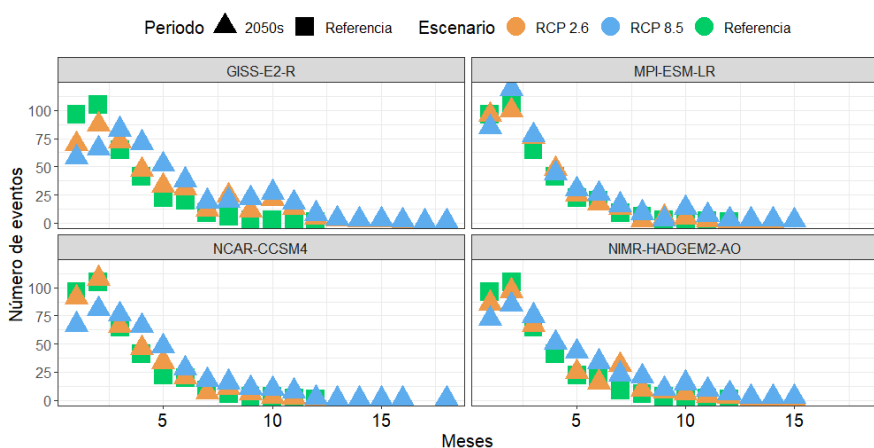
In relation to the magnitudes results, according to Hernández (2008), a magnitude greater than five is considered extremely strong; However, this criterion compared to the results of this research, they could be considered unfavorable for most of the stations analyzed on almost all models. Moreover, it is necessary to clarify that the criteria to define the effect of a magnitude depends on the consequences that

eventos de mayor magnitud y duración) para cada modelo y escenario. En los cuatro modelos, se registrarían eventos con duraciones a partir de los 9 meses y de magnitud superiores a nueve (>9). Los modelos GISS-E2-R, MPI-ESM-LR y NIMR-HADGEM2-AO coincidirían en que la estación Barinitas podría presentar un evento de magnitud mayor a 13 (>13) y por encima de 9 meses de duración. Para el modelo MPI-ESM-LR dicho evento pudiera durar hasta 15 meses y presentar una magnitud de 16.5. Por otro lado, Hato Urañón registraría el evento de mayor duración, 18 meses, y magnitud 12.8 bajo el modelo GISS-E2-R.

they generate in the environment where they are identified, since it is possible that in regions where environmental conditions are normally dry, a magnitude  $\geq 5$  possibly not generate, the same consequences as in normally humid regions.

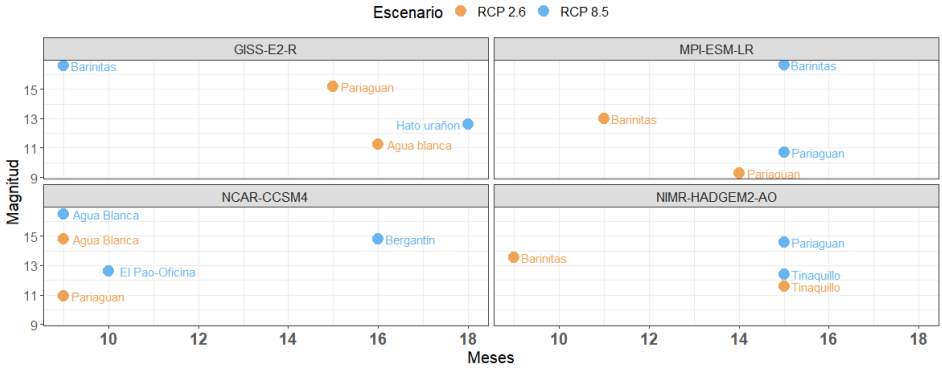
These results are similar to the results published in the first national communication on climate change for Venezuela, where an increase in the drought events occurrence was projected under the SRES scenarios (from the Special Report on Emission Scenarios) (MARN, 2005). The RCP scenarios showed similar behavior.

In general, drought has



**Figura 6.** Número total de eventos de sequía para todas las estaciones, por cada duración, periodos: referencia (1950(69)-1998) y 2050s, modelos: GISS-E2-R, MPI-ESM-LR, NCAR-CCSM4 y NIMR-HADGEM2-AO, y escenarios: RCP 2.6 y RCP 8.5.

**Figure 6.** Events total number of drought to all seasons and for each duration. Periods: Reference (1950 (69) -1998) and 2050s. Models: GISS-E2-R, MPI-ESM-LR, NCAR-CCSM4 and NIMR-HADGEM2-AO. Scenarios: RCP 2.6 and RCP 8.5.



**Figura 7. Estaciones con los eventos de mayor magnitud y duración de acuerdo a los modelos: GISS-E2-R, MPI-ESM-LR, NCAR-CCSM4 y NIMR-HADGEM2-AO, y escenarios: RCP 2.6 y RCP 8.5.**

**Figure 7. Stations with the highest magnitude and duration events according to the models: GISS-E2-R, MPI-ESM-LR, NCAR-CCSM4 and NIMR-HADGEM2-AO, and Scenarios: RCP 2.6 and RCP 8.5.**

El incremento en la cantidad de eventos de sequía presentado por los cuatro modelos, en comparación con el periodo de referencia, ya se viene presentando en esta región del país, tal y como se reporta en otras investigaciones (Olivares y Zingaretti, 2019). Desde el año 2000, gran parte del territorio venezolano ha sido afectado por sequías cada vez más duraderas y periódicas (Blunden y Arndt, 2015; Parra *et al.*, 2018); así como un aumento en la frecuencia de ocurrencia de periodos secos muy extremos (Paredes *et al.*, 2014; Olivares *et al.*, 2016). Para ambos RCP, este patrón podría llegar a intensificarse.

En relación con los resultados de las magnitudes, según Hernández (2008), una magnitud superior a cinco se considera extremadamente fuerte, por lo que, al contrastar este

the peculiar characteristic of deteriorating agricultural production components for longer periods of time, compared to the effects generated by storms, earthquakes and floods. In Venezuela, there are many activities that are affected by the water deficit that occurs during a period of drought, having as a consequence, food insecurity (Olivares *et al.*, 2016), the health deterioration of the population and repercussions on the main economy sectors (Olivares *et al.*, 2018). Therefore, in any model and scenario, this meteorological phenomenon would have an important impact on water resources (Paredes-Trejo *et al.*, 2018), as well as on the agricultural production of the stations analyzed in the future, following the same trend observed in other investigations in various parts

criterio con los resultados de esta investigación, podrían considerarse desfavorables para la mayoría de las estaciones analizadas en casi todos los modelos. Sin embargo, es necesario aclarar que el criterio para definir el efecto de una magnitud depende de las consecuencias que generan en el ambiente donde se identifican, ya que es posible que en regiones donde las condiciones ambientales son normalmente secas, una magnitud  $\geq 5$  posiblemente no genere las mismas consecuencias que en las regiones normalmente húmedas.

Estos resultados se asemejan a los resultados publicados en la primera comunicación nacional sobre cambio climático para Venezuela, donde se proyectó bajo los escenarios SRES (del Informe Especial sobre Escenarios de Emisión) un aumento en la ocurrencia de eventos de sequía (MARN, 2005). Los escenarios RCP mostraron un comportamiento similar.

En general, la sequía tiene la característica peculiar de deteriorar componentes agroproductivos por períodos más prolongados, en comparación a los efectos generados por las tormentas, sismos e inundaciones. En Venezuela, son muchas las actividades que son afectadas por el déficit hídrico que se presenta durante un periodo de sequía, teniendo como consecuencias la inseguridad alimentaria (Olivares *et al.*, 2016), el deterioro de la salud de la población y repercusiones en los sectores principales de la economía (Olivares *et al.*, 2018). Por lo tanto, en cualquier modelo y escenario, este fenómeno meteorológico tendría un impacto importante en los recursos hídricos

of the world (Bartholy *et al.*, 2013; Nam *et al.*, 2015).

The results obtained in this research are consistent with the projections made by the IPCC for the 21st century around the world. The most important agricultural regions of the country are likely to be compromised in the future by this type of extreme weather event, so it is essential to adopt appropriate adaptation strategies. In general, a drier future is evidenced, the plains agricultural areas being clearly distinguishable. This could cause a reduction in the aptitude of the land for these crops (Olivares *et al.*, 2020), besides the alteration of phenological phases, reduction of yields, affectation of agronomic work (time and method for preparing soil; sowing season; fertilization) and harvest impact. On the other hands, the RCP 2.6 scenario, it is seen as the only viable scenario for development and climate policies that guarantees the sustainability of resources for future generations.

## Conclusions

The drought would be marked by a different behavior for the analyzed stations, due to the rainfalls variability. For the monthly scale used, Barinitas station and Pariaguán station, showed the greatest risks resulting from droughts, presenting events with a greater magnitude and duration. From the proposed climate change scenarios, it can be expected that the RCP 8.5 scenario would bring a significant increase, as for the number

(Paredes-Trejo *et al.*, 2018), así como en la producción agrícola de las estaciones analizadas en el futuro, siguiendo la misma tendencia observada en otras investigaciones en varias partes del mundo (Bartholy *et al.*, 2013; Nam *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos son consistentes con las proyecciones hechas por el IPCC para el siglo XXI en todo el mundo. Es probable que las regiones agrícolas más importantes del país se vean comprometidas en el futuro por este tipo de fenómeno meteorológico extremo, por lo que es esencial adoptar estrategias de adaptación apropiadas. Se evidencia, en general, un futuro más seco, siendo claramente distinguibles las zonas agrícolas llaneras. Esto podría provocar una reducción de la aptitud de las tierras para estos cultivos (Olivares *et al.*, 2020), además de la alteración de las fases fenológicas, reducción de los rendimientos, afectación de las labores agronómicas (época y método para la preparación del suelo; época de siembra; fertilización) y afectación de cosecha. En cuanto al escenario RCP 2.6, es visto como el único escenario viable de desarrollo y políticas climáticas que garantiza la sostenibilidad de los recursos para las generaciones futuras.

## Conclusiones

La sequía estaría marcada por un comportamiento diferente para las estaciones analizadas, debido a la misma variabilidad de las precipitaciones. Para la escala mensual utilizada, la estación Barinitas y la estación Pariaguán mostrarían los mayores riesgos resultantes de las sequías,

of drought events in the study area as the duration and magnitude of these events, significantly affecting the agricultural development of the Venezuelan savannas. However, a climate change scenario, such as, the one presented in RCP 2.6, would have a lesser impact on the development of the region.

The use of the GISS-E2-R, MPI-ESM-LR, NCAR-CCSM4 and NIMR-HADGEM2-AO models allowed to have a broader vision for future rainfall scenarios in Venezuelan savannas besides the use of SPI for the drought estimation in climate change scenarios. This investigation opens a line of research in relation to the possibility to evaluate the impacts that could originate from a greater events occurrence in certain magnitudes and durations, where mitigation measures and strategic investment plans could be developed, in order to reduce the vulnerability of population in the localities, where future projections, were evaluated.

---

### *End of English Version*

---

presentando los eventos de mayor magnitud y duración. De los escenarios de cambio climático propuestos se puede prever que el escenario RCP 8.5 traería un incremento importante, no solo en la cantidad de eventos de sequía en la zona de estudio sino también en la duración y la magnitud de dichos eventos, afectando de manera importante el desarrollo agrícola de las sabanas venezolanas. No obstante, un escenario de cambio climático, como el presentado en el RCP 2.6, tendría un menor impacto en el desarrollo de la región.

El uso los modelos GISS-E2-R, MPI-ESM-LR, NCAR-CCSM4 y NIMR-HADGEM2-AO permitió tener una visión más amplia para los escenarios futuros de las precipitaciones en las sabanas venezolanas y el uso del SPI para la estimación de la sequía en escenarios de cambio climático. Este trabajo abre una línea de investigación en relación a la posibilidad de evaluar los impactos que podrían originarse por la mayor ocurrencia de eventos de determinadas magnitudes y duraciones, donde podrían desarrollarse medidas de mitigación y elaboración de planificaciones estratégicas en inversión con la finalidad de reducir la vulnerabilidad de la población de las localidades donde se evaluaron las proyecciones futuras

## Literatura citada

- ACFIMAN-SACC., 2018. First Academic Report on Climate Change 2018: Contribution of Working Groups I, II and III to the First Academic Report on Climate Change (PRACC) of the Academic Secretariat on Climate Change (SACC) of the Academy of Physical, Mathematical and Natural Sciences of Venezuela. [Villamizar, A., E. Buroz Castillo, R. Lairret Centeno, J. A. Gómez]. ACFIMAN EDITIONS – CITECI. 488 p.
- Bartholy, J., R. Pongrácz and B. Hollosi. 2013. Analysis of projected drought hazards for Hungary. *Adv. Geo.* 35: 61–66.
- Blunden, J. and D. S. Arndt. 2015. State of the Climate in 2014. *Bulletin of the American Meteorological Society.* 96(7): ES1-ES32.
- Edwards, D. C. and T. B. McKee. 1997. Characteristics of 20th century drought in the United States at multiple. *Climatology Report.* 2-97.
- FAO. 2018. The Impact of disasters and crises on agriculture and Food Security 2017. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 168 p.
- Hayes, M., M. Svoboda, N. Wall and M. Widhalm. 2011. The Lincoln declaration on drought indices: universal meteorological drought index recommended. *Bull. Am. Meteorol. Soc.* (92), 485–488.
- Hernández, R. 2008. Caracterización de la sequía meteorológica en los climas árido, semiárido y subhúmedo seco en los llanos centro orientales de Venezuela, para el manejo de los recursos hídricos. Trabajo de Grado de Magister en Gerencia Ambiental UNEFA-CIP.
- Hijmans, R.J., S.E. Cameron, J.L. Parra, P.G. Jones and A. Jarvis. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* 25: 1965-1978.
- IPCC. 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri, L.A. Meyer]. Geneva, Switzerland, 151 pp.
- Lloyd-Hughes, B. 2014. The impracticality of a universal drought definition. *Theor. Appl. Climatol.* 117 (3-4): 607–611.
- Marengo, J.A., S.C. Chou, R.R. Torres, A. Giarolla, L.M. Alves and A. Lyra. 2014. Climate Change in Central and South America: Recent Trends, Future Projections, and Impacts on Regional Agriculture. CCAFS Working Paper no. 73. CGIAR Research Program on Climate Change, Agriculture and Food Security (CCAFS). Copenhagen, Denmark.
- Martelo, M. 2003. La precipitación en Venezuela y su relación con el sistema climático. Caracas: Ministerio del Ambiente y los Recursos Naturales (MARN). 72 p.
- McKee, T., N. Doesken and J. Kleist. 1993. The relationship of drought frequency and duration to time scale. In: *Proceedings of the Eighth Conference on Applied Climatology*, Anaheim, California, 17



- to 22 from American Meteorological Society. 179-184.
- Mendoza, N. M. Puche. 2007. Evaluación de la ocurrencia de sequía en localidades de Venezuela. *Rev. Fac. Agr. (LUZ)*. 24 (4): 661-678.
- Ministerio del Ambiente y los Recursos Naturales (MARN). 2005. Primera Comunicación en Cambio Climático de Venezuela. Caracas: Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales, 164 p.
- Nam, W., M. Svoboda, M. Hayes and T. Tadesse. 2015. Drought hazard assessment in the context of climate change for South Korea. *Agricultural Water Management*. 160: 106-117.
- Navarro-Racines, C., J. Tarapues, P. Thornton, A. Jarvis and J. Ramirez-Villegas. 2020. High-resolution and bias-corrected CMIP5 projections for climate change impact assessments. *Sci Data*. 7(7): 1-14.
- Olivares, B., A. Cortez, D. Lobo, M. Parra, J. Rey y M. Rodríguez. 2016. Estudio de la Sequía Meteorológica en localidades de los llanos de Venezuela mediante el Índice de Precipitación Estandarizado. *Acta Nova*. 7(3): 266-283.
- Olivares, B., A. Cortez, R. Parra, D. Lobo, M.F. Rodríguez y J.C. Rey. 2017. Evaluation of agricultural vulnerability to drought weather in different locations of Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 34 (1): 103-129.
- Olivares, B., R. Hernández, R. Coelho, J.C. Molina, y Y. Pereira. 2018. Análisis espacial del índice hídrico: un avance en la adopción de decisiones sostenibles en territorios agrícolas de Carabobo, Venezuela. *Rev. eogr. A m . Cent.* 60 (1): 277-299.
- Olivares, B. and M.L. Zingaretti. 2019. Aplicación de métodos multivariados para la caracterización de periodos de sequía meteorológica en Venezuela. *Rev. Luna Azul*. 48(2): 172-192.
- Olivares, B., M. Araya-Alman, C. Acevedo-Opazo, J.C. Rey, P. Cañete-Salinas, F. Giannini, M. Balzarini, D. Lobo, J. A. Navas-Cortés, B. Landa and J. A. Gómez. 2020. Relationship Between Soil Properties and Banana Productivity in the Two Main Cultivation Areas in Venezuela. *J. Soil Sci Plant Nutr.* (2):1-13.
- OMM. 2012. OMM-Nº 1090 Guía de Usuario: Índice Normalizado de Precipitación. Ginebra, Suiza: OMM, 23 p.
- OMM. 2016. "Climate extremes, growing costs and loss: are we ready?". Disponible en: <https://public.wmo.int/en/events/events-of-interest/cop22>. Fecha de consulta: enero 2019.
- Paredes, F., F. La Cruz y E. Guevara. 2014. Análisis de las frecuencias de las sequías meteorológicas en la principal región cerealera de Venezuela. *Bioagro*. 26(1): 21-28.
- Paredes-Trejo, F., H. Barbosa, M. Moreno-Pizani y A. Fariás-Ramírez. 2018. Influencia de las sequías sobre el régimen hídrico de los ríos en Venezuela. Capítulo 9 (pp: 171-184). En: Rodríguez-Olarte, D. (Editor). Ríos en riesgo de Venezuela. Volumen 2. Colección Recursos hidrobiológicos de Venezuela. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA). Barquisimeto, Lara, Venezuela.
- Paredes-Trejo, F y B. Olivares. 2018. El desafío de la sequía en Venezuela. En: Núñez Cobo, J. y Verbist, K. (Eds.). Atlas de Sequía de América Latina y el Caribe. (pp.127-136). Francia: UNESCO.
- Parra, R., B. Olivares, A. Cortez, D. Lobo, M. F. Rodríguez y J. C. Rey. 2018. Características de la sequía meteorológica (1980-2014) en dos localidades agrícolas de los andes venezolanos *Revista de Investigación*. 42(95):38-55.
- Tabor, K. and J.W. Williams. 2010. Globally downscaled climate projections for assessing the conservation impacts of climate change. *Eco. Appli.* 20(2): 554-565.
- van Vuuren, D.P., J. Edmonds, M. Kainuma, K. Riahi, A. Thomson, K. Hibbard, G.C. Hurtt, T. Kram, V. Krey, J.-F. Lamarque, T. Masui, M. Meinshausen, N. Nakicenovic, S.J. Smith and S. K. Rose. 2011. The representative concentration pathways: an overview. *Climatic Change* 109(1):5-31.









## Technical note / Nota Técnica

### Respuesta agroproductiva de *Zea mays* L. con la aplicación foliar de VIUSID agro®

Agroproductive response of *Zea mays* L. with the foliar application of VIUSID agro®

Resposta agroprodutiva de *Zea mays* L. com a aplicação foliar de VIUSID agro®

Kolima Peña<sup>1,2\*</sup>, Alexander Calero-Hurtado<sup>2</sup>, Dilier Olivera-Viciedo<sup>2</sup>, Juan Carlos Rodríguez<sup>1</sup>, Thiago Fernandes<sup>2</sup>, Rinel García<sup>1</sup> y Gabriela Ajila<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Sancti Spíritus José Martí Pérez. Avenida de los Mártires 360, Sancti Spíritus, Cuba. Correos electrónicos: (KP) kolimapena@gamil.com ; (JR) jcarlos@uniss.edu.cu ; (RG) rainel@uniss.edu.cu . <sup>2</sup>Universidad São Paulo (UNESP), Escuela de Agricultura y Ciencias Veterinarias, Jaboticabal, SP- Brasil. Correos electrónicos: (AC) alexcalero34@gmail.com , (DO) dilierolvi@gmail.com, , (TF) thiagofeliph@hotmail.com , (GA) gabita31\_89@hotmail.com .

### Resumen

Los promotores del crecimiento pueden ser una alternativa para incrementar el crecimiento y la producción de los cultivos de importancia agrícola como el maíz. Para determinar el efecto del VIUSID agro® en la respuesta agroproductiva del maíz, se diseñaron dos experimentos en años consecutivos. Se realizó un diseño experimental en bloques al azar para evaluar cuatro tratamientos, VIUSID agro® (0,1; 0,3 y 0,5 L.ha<sup>-1</sup>) y un control, con tres repeticiones. Se evaluaron diferentes variables de crecimiento y desarrollo del cultivo incluido el rendimiento agrícola. Las dosis de mejor comportamiento en la mayoría de las variables en los dos experimentos fueron 0,3 y 0,5 L.ha<sup>-1</sup>. En el rendimiento agrícola en ambos experimentos los tratamientos de mejor comportamiento fueron las dosis 0,3 y 0,5 L.ha<sup>-1</sup> con un incremento promedio respecto al control de 24,55 y 45,06 %, respectivamente. Por lo que el VIUSID agro® favoreció la respuesta agroproductiva del maíz.

**Palabras claves:** aminoácido, maíz, granos, promotor del crecimiento.

Recibido el 19-02-2020 • Aceptado el 13-10-2020

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: kolimapena@gamil.com

## Abstract

Growth promoters can be an alternative to increase the growth and production of crops of agricultural importance such as corn. To determine the effect of VIUSID agro<sup>®</sup> on the agroproductive response of corn, two experiments were designed in consecutive years. In both, a randomized block experimental design was carried out to evaluate four treatments, VIUSID agro<sup>®</sup> (0.1, 0.3 and 0.5 L.ha<sup>-1</sup>) and a control, with three replications. Different variables of the growth and development of the crop, including agricultural yield were evaluated. The best performance doses in the several variables of two experiments were 0.3 and 0.5 L.ha<sup>-1</sup>. The treatments with the best performance in the agricultural yield in both experiments were the doses 0.3 and 0.5 L.ha<sup>-1</sup> with an average increase compared to the control of 24.55 and 45.06 % respectively. Therefore, VIUSID agro<sup>®</sup> favored the agro-productive response of corn.

**Keywords:** amino acid, corn, grains, growth promoter.

## Resumo

Os promotores de crescimento podem ser uma alternativa para aumentar o crescimento e a produção de culturas de importância agrícola como o milho. Para determinar o efeito do VIUSID agro<sup>®</sup> na resposta agroprodutiva do milho, dois experimentos foram realizados em anos consecutivos. O delineamento experimental foi em blocos casualizados para avaliar quatro tratamentos, VIUSID agro<sup>®</sup> (0,1; 0,3 e 0,5 L.ha<sup>-1</sup>) e uma testemunha, com três repetições. Foram avaliadas diferentes variáveis de crescimento e desenvolvimento da cultura, incluindo a produtividade agrícola. As doses com melhor desempenho na maioria das variáveis nos dois experimentos foram 0,3 e 0,5 L.ha<sup>-1</sup>. Na produtividade agrícola em ambos os experimentos os tratamentos com melhor desempenho foram as doses 0,3 e 0,5 L.ha<sup>-1</sup> com um aumento médio em relação ao controle de 24,55 e 45,06 %, respectivamente. Portanto, VIUSID agro<sup>®</sup> favoreceu a resposta agroprodutiva do milho.

**Palavras-chave:** aminoácido, milho, grãos, promotor de crescimento.

## Introducción

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos predominantes en los mercados internacionales, es el alimento básico para más de 200 millones de personas y se estima que este número crezca a medida que la población mundial alcance los 8,1 miles de millones de

## Introduction

Corn (*Zea mays* L.) is one of the predominant crops in international markets, it is the staple food for more than 200 million people and it is estimated that this number will grow as the world population reaches 8.1 thousand million

habitantes en 2025 (United Nation, 2017).

Según Faure *et al.* (2014), en Cuba dentro de las producciones de cultivos varios, el maíz constituye una de las más importantes. Según el anuario estadístico de Cuba (ONE, 2016) se siembran anualmente 185.922 ha de maíz de estas 7.286 ha pertenecen al sector estatal y 178.636 ha al sector privado. La producción total obtenida en esta área es de 427.295 t de ellas 13.882 t de sector estatal y 413.413 t del privado. El rendimiento promedio es de 2,30 t.ha<sup>-1</sup> entre los dos sectores, por lo que la producción es insuficiente e inversa a la demanda.

El VIUSID agro<sup>®</sup> pudiera ser una alternativa al incremento de la producción de maíz sin afectar el medio ambiente. En países como Cuba (Meléndrez *et al.* 2016) y Egipto (Atta *et al.*, 2017, Abdel-Lattif *et al.*, 2018;) se han reportados resultados satisfactorios con el uso de este producto. Sin embargo, aún las investigaciones son insuficientes partiendo de que las réplicas con diferentes especies, variedades y tratamientos en el tiempo, son un requisito en la investigación agropecuaria. Por lo que el objetivo de la investigación fue determinar el efecto de la aplicación foliar de dosis de VIUSID agro<sup>®</sup> en el comportamiento agroproductivo del cultivo de maíz (*Zea mays* L.).

## Materiales y métodos

Se realizaron dos experimentos en la Unidad Básica de Producción Cooperativa (UBPC) Sopimpa, Fomento, Sancti Spiritus, Cuba. La

inhabitants in 2025 (United Nations, 2017).

According to Faure *et al.* (2014), in Cuba within the productions of various crops, corn is one of the most important. According to the statistical yearbook of Cuba (ONE, 2016) 185,922 ha of corn are sown annually, of these 7,286 ha belong to state sector and 178,636 ha to private sector. The total production obtained in this area is 427,295 t, of which 13,882 t from state sector and 413,413 t from private sector. The average yield is 2.30 t.ha<sup>-1</sup> between the two sectors, so production is insufficient and inverse to demand.

VIUSID agro<sup>®</sup> could be an alternative to increasing corn production without affecting the environment. In countries such as Cuba (Meléndrez *et al.* 2016) and Egypt (Atta *et al.*, 2017, Abdel-Lattif *et al.*, 2018;) satisfactory results have been reported with the use of this product. However, research is still insufficient, based on the fact that replications with different species, varieties and treatments over time are a requirement in agricultural research. Therefore, the objective of the research was to determine the effect of the foliar application of VIUSID agro<sup>®</sup> doses on the agroproductive behavior of the corn (*Zea mays* L.) crop.

## Materials and methods

Two experiments were carried out in the Unidad Básica de Producción Cooperativa (UBPC) Sopimpa, Fomento, Sancti Spiritus, Cuba. The variety of corn that was used was the

variedad de maíz que se usó fue la “Criollo” y el tipo de suelo fue Fluvisol según la Base de Referencia Mundial para los Recursos de la Tierra, siglas en inglés, (WRB, 2014). La siembra del experimento 1 fue el 20 de abril de 2016 y la cosecha 122 días después de la siembra. Las variables climáticas durante el experimento fueron registradas por la Estación Provincial de Sancti Spiritus. La temperatura media diaria fue de 25,97 °C, la humedad relativa media diaria 77,36 % y la precipitación pluvial acumulada de 56,7 mm. La fecha de siembra del experimento 2 fue el 22 de mayo de 2017 y la cosecha 123 días después de la siembra. Las variables climáticas fueron: temperatura media diaria 25,97 °C, la humedad relativa media diaria 79,0 % y la precipitación pluvial acumulada de 71,12 mm. Ambos experimentos fueron plantados a inicios de la época lluviosa que es la etapa considerada óptima para las condiciones de Cuba.

Las semillas para la siembra fueron proporcionadas por el propio productor y proveniente del año anterior. Para la selección del área, la preparación de suelo, siembra, riego y el control de plagas se siguieron las normas técnicas del cultivo del maíz (MINAG, 2017).

El diseño experimental en ambos experimentos fue bloques al azar con 4 tratamientos y tres réplicas. Las parcelas fueron de 30 m<sup>2</sup> para un área experimental de 360 m<sup>2</sup>, la defensa interna por parcelas fue de 0,5 m<sup>2</sup> y el área de cálculo de 20 m<sup>2</sup>. Se evaluaron 10 plantas por parcelas, 30 por tratamiento, escogidas al azar en la superficie de cálculo.

“Criollo” and the soil type was Fluvisol according to the World Reference Base for Land Resources, (WRB, 2014). The sowing of experiment 1 was on April 20, 2016 and the harvest 122 days after sowing. The climatic variables during the experiment were registered by the Estación Provincial de Sancti Spiritus. The average daily temperature was 25.97 °C, the average daily relative humidity was 77.36 % and the accumulated rainfall was 56.7 mm. The sowing date of experiment 2 was May 22, 2017 and the harvest was 123 days after sowing. The climatic variables were: Average daily temperature 25.97 °C, average daily relative humidity 79.0 % and accumulated rainfall of 71.12 mm. Both experiments were planted at the beginning of the rainy season, which is the stage considered optimal for Cuban conditions.

The seeds for sowing were provided by the producer himself and from the previous year. For the selection of the area, soil preparation, planting, irrigation and pest control, the technical standards for corn cultivation were followed (MINAG, 2017).

The experimental design in both experiments was randomized blocks with 4 treatments and three replications. The plots were 30 m<sup>2</sup> for an experimental area of 360 m<sup>2</sup>, the internal defense per plot was 0.5 m<sup>2</sup> and the calculation area was 20 m<sup>2</sup>. 10 plants were evaluated per plots, 30 per treatment, random chosen on the calculation surface.

The foliar application in both experiments was in the morning

La aplicación foliar en ambos experimentos fue en horas de la mañana, se usó un aspersor foliar de espalda con capacidad de 16 litros. Se realizaron tres aplicaciones a los 15, 30 y 45 días después de la germinación. Los tratamientos en ambos experimentos fueron: Un control, cero aplicaciones de VIUSID agro® y 0,1; 0,3 y 0,5 L.ha<sup>-1</sup> VIUSID agro® la composición del producto se encuentra detallada según (Peña *et al.*, 2018c).

Se realizaron dos evaluaciones de las variables y se tuvo en cuenta aspectos del descriptor varietal de maíz propuesto por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (Muñoz *et al.*, 2004). La primera evaluación fue a los 90 días después de la siembra. Las variables evaluadas fueron: longitud de la planta (cm), diámetro del tallo (cm), área foliar (cm<sup>2</sup>). En el momento de la cosecha se evaluó: altura de inserción de la mazorca (cm), longitud de la mazorca (cm), diámetro de la mazorca (cm), masa de la mazorca (g), número de hileras por mazorca, número de granos por mazorca, masa de los granos por mazorca (g), masa de 1000 granos (g) y rendimiento agrícola (t.ha<sup>-1</sup>).

Para la longitud de la planta se usó una cinta métrica y la planta se midió desde el cuello de la raíz hasta el ápice. El diámetro del tallo se midió a los 100 cm de longitud con la ayuda de un calibre o venier. La longitud de la mazorca y la altura de inserción de la misma, se determinó con el uso de la cinta métrica. Para el área foliar se midió el largo y ancho de las hojas y se calculó con la siguiente fórmula  $AF = (L \times A) / F$  donde AF es el área foliar, L es el largo de la hoja, A es el ancho y F es el factor según el

hours, a back-mounted foliar sprinkler with a capacity of 16 liters was used. Three applications were made at 15, 30 and 45 days after germination. The treatments in both experiments were: A control, zero applications of VIUSID agro® and 0.1; 0.3 and 0.5 L.ha<sup>-1</sup> VIUSID agro® the composition of the product is detailed according to Peña *et al.* (2018c).

Two evaluations of the variables were carried out and aspects of the maize varietal descriptor proposed by the Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (Muñoz *et al.*, 2004) were taken into account. The first evaluation was 90 days after sowing. The variables evaluated were: plant length (cm), stem diameter (cm), leaf area (cm<sup>2</sup>). At the time of harvest, the following were evaluated: ear insertion height (cm), ear length (cm), ear diameter (cm), ear mass (g), number of rows per ear, number of grains per ear, mass of grains per ear (g), mass of 1000 grains (g) and agricultural yield (t.ha<sup>-1</sup>).

For length of the plant a tape measure was used and the plant was measured from the root neck to the apex. The diameter of the stem was measured at 100 cm in length with the help of a caliper or venier. The length of the ear and its height of insertion, was determined with the use of the measuring tape. For the leaf area, the length and width of the leaves were measured and it was calculated with the following formula  $AF = (L \times A) / F$  where AF is the leaf area, L is the length of the leaf, A is the width and F is the factor according to the crop. The number of rows and kernels

cultivo. El número de hileras y de granos por mazorca fue contado manualmente. Con la balanza del tipo digital Sartorius, con una precisión de 0,01 g se determinó la masa de la mazorca y granos, el rendimiento se estimó a través del método indirecto.

Los datos se procesaron con el paquete estadístico SPSS v. 15.1.0 para el Windows (SPSS, 2006) para Windows. Para la normalidad se realizó la prueba de Kolmogorov – Smirnov y la dócima de Levene para la homogeneidad. Cuando existió normalidad y homogeneidad se realizó un análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA) y la prueba de rangos múltiples de Tukey cuando ( $p < 0,05$ ). La prueba de Kruskal – Wallis y prueba U de Mann – Whitney se aplicó cuando no existía normalidad de los datos.

## Resultados y discusión

El ANOVA reveló diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos en todas las variables evaluadas (cuadro 1). Se observó el efecto de los tratamientos en la LP a los 90 días después de la siembra (dds). El comportamiento más favorable en el experimento 1 fue alcanzado con el tratamiento  $0,5 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$  de VIUSID agro® el que difirió significativamente del control y del resto de los tratamientos con el producto. El incremento respecto al no tratado fue de 11,61 %. En el experimento 2 (cuadro 1) en la LP, todos los tratamientos con el VIUSID agro® difirieron significativamente del control excepto la dosis menor. Obteniéndose los mayores valores para los tratamientos  $0,3$  y  $0,5 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$  con incrementos de 10,08 y 16,47 % en comparación con el control.

per ear was counted manually. With the Sartorius digital scale, with a precision of 0.01 g, the mass of the cob and grains was determined, the yield was estimated through the indirect method.

Data were processed with the statistical package SPSS v. 15.1.0 for Windows (SPSS, 2006) for Windows. For normality, the Kolmogorov - Smirnov test and the Levene test for homogeneity were performed. When normality and homogeneity existed, a simple classification analysis of variance (ANOVA) was performed and the Tukey multiple range test when  $p < 0.05$ . The Kruskal - Wallis test and the Mann - Whitney U test were applied when there was no normality of the data.

## Results and discussion

The ANOVA revealed significant differences ( $p < 0.05$ ) between the treatments in all the variables evaluated (table 1). The effect of the treatments on the LP can be seen at 90 days after sowing (dds). The most favorable behavior in experiment 1 was achieved with the treatment  $0.5 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$  of VIUSID agro®, which differed significantly from the control and from the rest of the treatments with the product. The increase compared to the untreated was 11.61 %. In experiment 2 (table 1) in the LP, all the treatments with VIUSID agro® differed significantly from the control except the lower dose. Obtaining the highest values for the treatments  $0.3$  and  $0.5 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$  with increments of 10.08 and 16.47 % compared to the control.



**Cuadro 1. Efecto de los tratamientos de VIUSID agro® en la longitud de la planta, el diámetro del tallo, el área foliar, altura de la inserción de la mazorca, en el número de hileras por mazorca, granos por hilera, granos por mazorca, masa de los granos, masa de 1000 granos y el rendimiento agrícola. Unidad Básica de Producción Cooperativa (UBPC) Sopimpa, Fomento, Sancti Spiritus, Cuba.**

**Table 1. Effect of VIUSID agro® treatments on plant length, stem diameter, leaf area, ear insertion height, number of rows per ear, grains per row, mass of grains, mass of 1000 grains and agricultural yield. Unidad Básica de Producción Cooperativa (UBPC) Sopimpa, Fomento, Sancti Spiritus, Cuba.**

Tratamientos (L.ha <sup>-1</sup> )	LP (cm)	DT (cm)	AF (cm <sup>2</sup> )	AI (cm)	NH	GM	MG (g)	M1000 (g)	R (t.ha <sup>-1</sup> )
Experimento 1									
Control	259,63±2,49 b	1,17±0,002 b	803,00±8,62 a	163,87±2,73 b	14,47±0,25 b	487,40±11,77 c	151,54±5,64 c	310,76±8,33 c	5,61±0,23 c
0,1	270,13±2,76 b	1,37±0,002 a	779,00±7,59 a	167,18±2,57 ab	14,60±0,31 b	527,20±13,85 b	171,77±5,84 b	328,52±10,35 b	6,36±0,24 b
0,3	271,60±2,57 b	1,42±0,002 a	800,00±8,34 a	170,45±3,56 a	15,60±0,35 a	594,38±14,32 a	196,65±6,36 a	331,52±8,63 b	7,28±0,27 a
0,5	289,77±1,68 a	1,40±0,002 a	842,00±8,19 a	174,23±1,73 a	16,33±0,36 a	617,80±15,70 a	210,83±6,78 a	343,19±9,86 a	7,80±0,28 a
CV(%)	5,01	7,22	11,75	9,03	12,39	16,53	22,15	15,77	22,21
Experimento 2									
Control	182,17±1,84 c	1,11±0,001 c	529,90±9,40 b	85,00±1,09 b	13,20±0,32 a	422,74±13,01 b	155,30±5,87 c	368,29±10,14 b	4,19 ±0,15 c
0,1	193,63±2,31 bc	1,56±0,002 b	576,30±8,39 ab	91,98±1,55 b	12,80±0,28 a	453,37±14,07 b	159,13±3,65 c	358,15±10,85 b	4,30 ±0,09 c
0,3	200,53±3,08 ab	1,62±0,002 a	611,75±9,01 a	100,57±1,75 a	13,27±0,31 a	512,18±15,44 a	185,00±3,54 b	367,66±10,31 b	5,00 ±0,09 b
0,5	212,20±3,11 a	1,66±0,003 a	706,75±9,22 a	99,50±4,26 a	13,40±0,27 a	537,72±12,67 a	234,60±5,41 a	441,87±12,67 a	6,33 ±0,14 a
CV (%)	9,13	16,78	17,01	15,80	11,93	18,23	22,23	17,87	22,17

Valores representados por las medias de tres réplicas ± Error estándar (E.E.). Medias con letras desiguales en la misma columna difieren para (P<0,05) según prueba de rangos múltiples de Tukey. LP: longitud de las plantas; DT: diámetro del tallo; LHD: longitud de la hoja bandera; AHB: ancho de la hoja bandera; AI: Altura de inserción de la mazorca; NH: número de hileras; GM: granos por mazorca; MG: masa de los granos; M1000: masa de mil granos; R: rendimiento agrícola.

Values represented by the means of three replications ± Standard error (S.E.). Means with unequal letters in the same column differ for P <0.05 according to Tukey's multiple range test. LP: length of the plants; DT: stem diameter; LHD: length of the flag leaf; AI: Height of ear insertion; NH: number of rows; GM: grains per ear; MG: mass of the grains; M1000: mass of thousand grains; A: agricultural yield.



Para el diámetro del tallo, en el experimento 1 cuadro 1, los comportamientos más favorables fueron de los tratamientos con VIUSID agro<sup>®</sup> que no difirieron entre ellos, pero superaron significativamente al control en 17,09; 21,37 y 19,66 %. En el experimento 2 cuadro 1 el diámetro de tallo fue significativamente superior cuando se realizaron aplicaciones foliares de VIUSID agro<sup>®</sup>. Los tratamientos de mejor comportamiento fueron las dosis 0,3 y 0,5 L.ha<sup>-1</sup> de VIUSID agro<sup>®</sup> con incrementos en relación al control de 45,95 y 49,55 %, respectivamente.

En el área foliar solo se observaron diferencias estadísticas significativas en el experimento 2 para la dosis 0,5 L.ha<sup>-1</sup> de VIUSID que difirió del control y lo superó en 33,74 %. En la altura de inserción de la mazorca (AI) solamente existieron diferencias significativas en el experimento 2 en los tratamientos con dosis de 0,3 y 0,5 L.ha<sup>-1</sup> de VIUSID con un incremento en relación al control de un 18,32 y 17,06 % (cuadro 1).

En el experimento 1, se observó que en el número de hileras (NH) los tratamientos de mejor comportamiento fueron las dosis 0,3 y 0,5 L.ha<sup>-1</sup> de VIUSID y superaron al control en 1,13 y 1,86 hileras por mazorca lo que significó un incremento del 7,81 y 12,85 %, respectivamente.

En la variable granos por mazorca (GM) en el experimento 1 y 2 el comportamiento más favorable fue de los tratamientos con VIUSID agro<sup>®</sup> con dosis de 0,3 y 0,5 L.ha<sup>-1</sup> con un incremento en relación al control de 21,94 y 26,75 %, experimento 1 y 21,16

For stem diameter, in experiment 1 table 1,, the most favorable behaviors were of the treatments with VIUSID agro<sup>®</sup> that did not differ between them, but significantly exceeded the control in 17.09; 21.37 and 19.66 %. In experiment 2, table 1, the stem diameter was significantly higher when foliar applications of VIUSID agro<sup>®</sup> were made. The treatments with the best performance were the doses 0.3 and 0.5 L.ha<sup>-1</sup> of VIUSID agro<sup>®</sup> with increases in relation to the control of 45.95 and 49.55 %, respectively.

In the foliar area, only significant statistical differences were observed in experiment 2 for the dose 0.5 L. ha<sup>-1</sup> of VIUSID, which differed from the control and exceeded it by 33.74 %. In the height of insertion of the ear (AI) there were only significant differences in experiment 2 in the treatments with doses of 0.3 and 0.5 L. ha<sup>-1</sup> of VIUSID with an increase in relation to the control of 18, 32 and 17.06 % (table 1).

In experiment 1, it was observed that in the number of rows (NH) the treatments with the best performance were the doses 0.3 and 0.5 L.ha<sup>-1</sup> of VIUSID and they surpassed the control in 1.13 and 1.86 rows per ear which meant an increase of 7.81 and 12.85 %, respectively.

In the variable grains per ear (GM) in experiment 1 and 2 the most favorable behavior was of the treatments with VIUSID agro<sup>®</sup> with doses of 0.3 and 0.5 L.ha<sup>-1</sup> with an increase in relation to the control of 21.94 and 26.75 %, experiment 1 and

y 27,20 % experimento 2. En la masa de los granos en ambos experimentos el comportamiento fue similar hubo un incremento significativo entre los tratamientos a medida que se incrementó la dosis de VIUSID agro® en el experimento 1 fueron los tratamientos 0,3 y 0,5 L.ha<sup>-1</sup> de VIUSID agro® los de comportamiento más favorable con incrementos en relación al control de 29,77 y 39,12 %. En el experimento 2 fue de la dosis 0,5 L.ha<sup>-1</sup> la que difirió del resto de los tratamientos para un incremento en la producción por planta del 51,06 % (cuadro 1).

En la masa de 1000 granos en ambos (cuadro 1) el comportamientos más favorables fue con el tratamiento 0,5 L.ha<sup>-1</sup> de VIUSID agro® e incrementos respecto al control de 10,44 % experimento 1 y 19,98 %, experimento 2 (cuadro 1).

En el rendimiento agrícola, en ambos experimentos los resultados más favorables se alcanzaron con las dosis 0,3 y 0,5 L.ha<sup>-1</sup> de VIUSID agro® para un aumento de la producción del 29,77 y 39,04 % en el experimento 1 y de 19,33 y 51,07 % en el experimento 2

En este estudio se demostró que el VIUSID agro® desempeña un rol importante en el crecimiento de las plantas maíz. Estos efectos favorables pudieron estar atribuido a que actúa como biorregulador natural, debido a su composición (Peña *et al.*, 2018c), que favorecen los procesos de germinación, floración, producción de frutos, metabolismo de los aminoácidos y en la síntesis de bases nitrogenadas requerida para la formación

21.16 and 27.20 % experiment 2. In the mass of the grains in both experiments the behavior was similar, there was a significant increase between the treatments as the dose was increased of VIUSID agro® in experiment 1 were the treatments 0.3 and 0.5 L.ha<sup>-1</sup> of VIUSID agro® those with the most favorable behavior with increases in relation to the control of 29.77 and 39.12 %. In experiment 2, the dose of 0.5 L.ha<sup>-1</sup> was the one that differed from the rest of the treatments for an increase in production per plant of 51.06 % (table 1).

In the mass of 1000 grains in both (table 1) the most favorable behavior was with the treatment 0.5 L.ha<sup>-1</sup> of VIUSID agro® and increases compared to the control of 10.44 % experiment 1 and 19.98 %, experiment 2 (table 1).

In agricultural yield, in both experiments the most favorable results were achieved with the doses 0.3 and 0.5 L.ha<sup>-1</sup> of VIUSID agro® for an increase in production of 29.77 and 39.04 % in the experiment 1 and 19.33 and 51.07 % in experiment 2.

In this study it was shown that VIUSID agro® plays an important role in the growth of corn plants. These favorable effects could be attributed to the fact that it acts as a natural bioregulator, due to its composition (Peña *et al.*, 2018c), which favor germination, flowering, fruit production, amino acid metabolism and the synthesis of nitrogenous bases. required for the formation of new tissues. In addition, it is widely known that biostimulants play an important role, because they stimulate metabolic, physiological and

de nuevos tejidos. Además, es ampliamente conocido que los bioestimulantes desempeñan un papel importante, porque estimulan procesos metabólicos, fisiológicos y bioquímicos que favorecen el crecimiento y desarrollo de las plantas (Yakhin *et al.*, 2017).

Por otra parte, con la investigación se verificaron los efectos bioestimulantes de la utilización del VIUSID agro® en las plantas de maíz. Descubrimientos recientes han demostrado que este producto favorece el incremento de algunos indicadores en plantas de maíz, con la aplicación de dosis de 0,2 L.ha<sup>-1</sup> cada 7 y 10 días (Atta *et al.*, 2017, Abdel-Lattif *et al.*, 2018), quienes incrementaron parámetros morfológicos con la aplicación de este producto. Otros autores como (Meléndrez *et al.* 2016) recomendaron el uso de VIUSID agro para el incremento del rendimiento en maíz.

Otras investigaciones han demostrado los efectos bioestimulantes de la aplicación foliar del VIUSID agro® en plantas de anturio (*Anturium andreanum* Lind) (Peña *et al.*, 2015a), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Peña *et al.*, 2015a; 2015b; 2017b), cebolla (*Allium cepa* L.); lechuga (*Lactuca sativa* L.) y la acelga (*Beta vulgaris* var. Cicla) (Peña *et al.*, 2017a), rábano (*Raphanus sativus* L.) (Peña *et al.*, 2018a, 2018c) 0,5, 0.7 y 1.0 L.ha<sup>-1</sup> del promotor del crecimiento y un control. Dentro de los indicadores evaluados estuvieron la masa fresca y seca de la planta. Se evaluaron el diámetro polar y ecuatorial del tallo fresco, los índices

biochemical processes that favor plant growth and development (Yakhin *et al.*, 2017).

On the other hand, the research verified the biostimulant effects of the use of VIUSID agro® in corn plants. Recent discoveries have shown that this product favors the increase of some indicators in corn plants, with the application of doses of 0.2 L.ha<sup>-1</sup> every 7 and 10 days (Atta *et al.*, 2017, Abdel-Lattif *et al.*, 2018), who increased morphological parameters with the application of this product. Other authors such as (Meléndrez *et al.* 2016) recommended the use of VIUSID agro® to increase corn yield.

Other investigations have demonstrated the biostimulant effects of the foliar application of VIUSID agro® in anthurium plants (*Anturium andreanum* Lind) (Peña *et al.*, 2015a), beans (*Phaseolus vulgaris* L.) (Peña *et al.*, 2015a; 2015b; 2017b), onion (*Allium cepa* L.); lettuce (*Lactuca sativa* L.) and chard (*Beta vulgaris* var. Cicla) (Peña *et al.*, 2017a), radish (*Raphanus sativus* L.) (Peña *et al.*, 2018a, 2018c), beet (*Beta vulgaris* L.) (Peña *et al.*, 2017a), tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) (Peña *et al.*, 2018b) and Chinese cabbage (*Brassica rapa* subsp) (Peña *et al.*, 2019).

## Conclusions

The application of the VIUSID agro® growth promoter improves the growth and development of corn plants, showing that as the dose of VIUSID agro® is increased, the agroproductive behavior of the crop improves considerably.

de crecimiento fisiológicos, eficiencia foliar y productiva y rendimiento agrícola. Los resultados mostraron incrementos significativos ( $P \leq 0,05$ , remolacha (*Beta vulgaris* L.) (Peña et al., 2017a), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Peña et al., 2018b) y la col china (*Brassica rapa* subsp) (Peña et al., 2019).

## Conclusiones

La aplicación del promotor del crecimiento VIUSID agro® mejora el crecimiento y desarrollo de las plantas de maíz, evidenciándose que a medida que se aumenta la dosis de VIUSID agro® el comportamiento agroproductivo del cultivo mejora considerablemente.

Los hallazgos de este estudio sugieren que el VIUSID agro® desempeña un rol importante en plantas de maíz en condiciones de campo y constituye una alternativa eficiente para incrementar la producción de este cultivo.

## Literatura citada

- Abdel-Lattif, H.M., R. Absy and M.M. Atta. 2018. Effect of growth promoter supplement on yield and grain quality of maize (*Zea mays* L.). Egypt J. Agron. 40(2):165–180.
- Atta, M.M.M., H.M. Abdel-Lattif and R. Absy. 2017. Influence of biostimulants supplement on maize yield and agronomic traits. Biosci Res. 14(3):604–615.
- Faure, B., R. Benítez, E. Rodríguez, O. Grande, M. Torres y P. Pérez. 2014. Guía técnica para la producción de frijol común y maíz. Primera edición. Ministerio de la Agricultura. La Habana, Cuba. 56 p.

The findings of this study suggest that VIUSID agro® plays an important role in corn plants under field conditions and constitutes an efficient alternative to increase the production of this crop.

---

## End of English Version

---

- Meléndrez, J. F. K. Peña, y M. Cristo. 2016. Efecto de tres dosis de VIUSID agro en el cultivo del maíz (*Zea mays* L.) en el municipio de Taguasco. Infociencia 20(3):1–12.
- MINAG (Ministerio de la Agricultura). 2017. Instructivo técnico para la producción de maíz. Primera edición. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba. 56 p.
- Muñoz, G., Giraldo, G., Fernández, S., 2004. Descriptores varietales arroz, frijol, maíz, Segunda edición. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Palmira, Colombia. 225 p.
- ONE. 2016. Agricultura, ganadería, silvicultura y pesca. Producción agrícola por cultivos seleccionados. Edición 2017; 32p.
- Peña, K., D. Olivera, A. Calero, J.C., Rodríguez, B. Kukurtcu, Y.M., Placencia and A. Castro. 2019. Productive response of *Brassica rapa* L. subsp. chinensis to application of VIUSID Agro. J. Agric. Sci. Technol. B. 9:103–109.
- Peña, K., J.C. Rodríguez, N. León, C.D. Valle y M. Cristo. 2018a. Efecto de un promotor del crecimiento en características morfofisiológicas y productivas del rábano (*Raphanus sativus* L.). Av. Investig. Agropecu. 22(1):29–45.
- Peña, K., J.C. Rodríguez, D. Olivera, A. Calero, R. Dorta, J.F. Meléndrez, Y. Fernando and B. Kukurtcu. 2018b. Effect of the growth promoter VIUSID agro on the morphophysiological and productive performance of tobacco growth (*Nicotiana tabacum* L.). J. Agric. Sci. Technol. B. 8:157–167.









- Peña, K., J.C., Rodríguez, D. Olivera, A. Calero Hurtado, J.F. Meléndrez y R. García. 2018c. VIUSID Agro® dose effect on the morpho-physiological and productive behavior of radish (*Raphanus sativus* L.). Rev. Fac. Agron. (LUZ). 35(3):293–317.
- Peña, K., J.C. Rodríguez, D. Olivera, J.F. Meléndrez, L. Rodríguez, R. Valdéz y L. Rodríguez. 2017a. Effects of growth promoter on different vegetable crops. Int. J. Dev. Res. 7(2):11737–11743.
- Peña, K., J.C. Rodríguez, M. Santana, D. Olivera, C. D. Valle y R. Dorta. 2017b. Effects of a growth promoter on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) crops. Acta Agron. 66(3):360–366.
- Peña, K., J.C. Rodríguez y J.F. Meléndrez. 2016. El VIUSID agro una alternativa en el incremento de la producción de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Rev. Caribeña Cienc. Soc. 2016: 1–6. Disponible en <http://www.eumed.net/rev/caribe/2016/05/viusid.html> Fecha de consulta enero de 2017.
- Peña, K., J.C. Rodríguez y J.F. Meléndrez. 2015a. Efecto de la aplicación de un promotor del crecimiento activado molecularmente en el cultivo de *Anthurium andreaeanum* Lind. Rev. Granma Cienc. 19(2):1–12.
- Peña, K., J.C. Rodríguez y M. Santana. 2015b. Comportamiento productivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) ante la aplicación de un promotor del crecimiento activado molecularmente. Avances. 17(4):327–337.
- SPSS Statistical Software. 2006. Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 15.0.1. Chicago, USA: SPSS Inc.
- United Nations. 2017. World Population Prospects 2017. Probabilistic Projections. Population Division. United Nations. New York. Disponible en <https://population.un.org/wpp/Download/Probabilistic/Population/>. Fecha de consulta: marzo 2018.
- WRB, Iuss working group. World reference base for soil resources. 2014. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resources Reports No. 106. FAO, Rome.
- Yakhin, O.I., A.A. Lubyaynov, I.A. Yakhin and P.H. Brown. 2017. Biostimulants in plant science: A global perspective. Front. Plant Sci. 7:2049.

## Complejos virales en la interacción *Allium cepa* L.- *Frankliniella occidentalis* P., por DAS-ELISA en Baja California, México

Viral complexes in the *Allium cepa* L.- *Frankliniella*  
*occidentalis* P. interaction by DAS-ELISA in Baja  
California, Mexico

Complexos virais na interação *Allium cepa* L.-  
*Frankliniella occidentalis* P. por DAS-ELISA em Baja  
California, México

Raúl Enrique Valle-Gough<sup>1</sup>, Blanca Yesenia Samaniego-  
Gómez<sup>1\*</sup>, Lourdes Cervantes-Díaz<sup>1</sup>, Samuel Uriel Samaniego-  
Gómez<sup>1</sup>, René Garruña-Hernández<sup>2</sup>, Fidel Núñez-Ramírez<sup>1</sup>,  
Esaú Ruiz-Sánchez<sup>2</sup> y Ariana Isabel Torres-Bojórquez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma de Baja California. Carr. Blvd. Delta s/n Ejido Nuevo León, Valle de Mexicali, Baja California C.P. 21705. Correo electrónico: (RV) [raul.valle@uabc.edu.mx](mailto:raul.valle@uabc.edu.mx), ; (BS) [samaniego.blanca@uabc.edu.mx](mailto:samaniego.blanca@uabc.edu.mx), ; (LC) [lourdescervantes@uabc.edu.mx](mailto:lourdescervantes@uabc.edu.mx), ; (SS) [samaniegos@uabc.edu.mx](mailto:samaniegos@uabc.edu.mx), ; (FN) [fidel.nunez@uabc.edu.mx](mailto:fidel.nunez@uabc.edu.mx), ; (AT) [torres.ariana@uabc.edu.mx](mailto:torres.ariana@uabc.edu.mx), . <sup>2</sup>Instituto Tecnológico de Conkal, Conkal, Yucatán, México. C.P. 97345. Correo electrónico: (RG) [renegh10@hotmail.com](mailto:renegh10@hotmail.com), ; (ER) [esau\\_ruiz@hotmail.com](mailto:esau_ruiz@hotmail.com), .

### Resumen

La cebolla (*Allium cepa* L.) es de las principales especies hortícolas producidas en Baja California, México. En este cultivo se han observado síntomas presuntivos de virus que pueden provocar pérdidas en rendimiento y calidad. El objetivo de esta investigación fue detectar virus asociados a cebolla cultivada en zonas de alta producción de Baja California. Se colectaron muestras de material vegetal (síntomáticos y asintomáticos) y de insectos trips en parcelas comerciales. Se utilizaron antisueros comerciales para detectar Iris yellow spot virus (IYSV), Tomato spot wild virus (TSWV), Leek yellow spot virus (LYSV), Onion yellow spot virus (OYDV) y Garlic common latent virus (GarCLV). Siete especies de plantas

Recibido el 21-09-2020 • Aceptado el 09-11-2020

\*Autor de correspondencia Correo electrónico: [samaniego.blanca@uabc.edu.mx](mailto:samaniego.blanca@uabc.edu.mx)



indicadoras fueron inoculadas mecánicamente con savia de cebollas (sintomáticas y asintomáticas). Los resultados mostraron presencia de IYSV, TSWV, OYDV, LYSV y GarCLV en las cebollas sintomáticas. De las muestras vegetales, el 77 % mostraron incidencia en forma de complejos virales y en 23 % sólo fue detectada la presencia de LYSV. Trips identificados como *Frankliniella occidentalis* P. portaban IYSV, TSWV, LYSV, OYDV y GarCLV en forma de complejos, en La Trinidad y San Quintín. En las plantas indicadoras no se observaron síntomas de virosis. Es evidente que *F. occidentalis* P. es responsable de transmitir los virus analizados en este estudio en cebolla cultivada. No existen reportes previos sobre detección de Orthotospovirus, Potyvirus y Carlavirus en cebolla en Baja California.

**Palabras clave:** Orthotospovirus, IYSV, LYSV, Trips, TSWV.

### Abstract

The onion (*Allium cepa* L.) is one of the main horticultural crops produced in Baja California, Mexico. In this crop, it has been observed presumptive viral symptoms, which are able to cause losses in yield and quality. Therefore, the objective of this study was to detect the associated virus in onion in high producing culture zones in Baja California. Plant material samples (symptomatic and asymptomatic) and trips insects were collected from commercial farming or areas. Commercial anti-serum were used for the detection of Iris yellow spot virus (IYSV), Tomato spot wilt virus (TSWV), Leek yellow spot virus (LYSV), Onion yellow dwarf virus (OYDV) and Garlic common latent virus (GarCLV). Seven indicator plants species were mechanically inoculated with onion sap (symptomatic and asymptomatic). The results showed the presence of IYSV, TSWV, OYDV and GarCLV in symptomatic onion plants. The plant samples showed a 77 % of incidence in the form of viral complexes and in a 23 % only the presence of LYSV was detected. The trips identified as *Frankliniella occidentalis* P. harbored IYSV, TSWV, LYSV, OYDV and GarCLV in the form of complexes in La Trinidad and San Quintin. The indicator plants did not show symptoms of virosis. It is evident that *F. occidentalis* P. is responsible for the transmission of the analyzed viruses in this study in cultured onions. There are not previous reports for the detection of Orthotospovirus, Potyvirus and Carlavirus in Baja California onions.

**Keywords:** Orthotospovirus, IYSV, LYSV, Trips, TSWV.

### Resumo

A cebola (*Allium cepa* L.) é uma das principais espécies hortícolas produzidas na Baja California, México. Nessa cultura, foram observados sintomas presuntivos de vírus, que podem causar perdas de rendimento e qualidade. O objetivo desta pesquisa foi detectar vírus associados a cebolas cultivadas em áreas de alta produção



da Baja California. Amostras de material vegetal (sintomático e assintomático) e insetos tripses foram coletadas em parcelas comerciais. Os anti-soros comerciais foram usados para detectar Iris yellow spot virus (IYSV), Tomato spot wild virus (TSWV), Leek yellow spot virus (LYSV), Onion yellow spot virus (OYDV) e Garlic common latent virus (GarCLV). Sete espécies de plantas indicadoras foram inoculadas mecanicamente com seiva de cebola (sintomáticas e assintomáticas). Os resultados mostraram a presença de IYSV, TSWV, OYDV, LYSV e GarCLV nas cebolas sintomáticas. Das amostras de plantas, 77 % apresentaram incidência na forma de complexos virais e em 23 % apenas a presença de LYSV foi detectada. Thrips identificados como *Frankliniella occidentalis* P. carregavam IYSV, TSWV, LYSV, OYDV e GarCLV como complexos, em La Trinidad e San Quintín. Nas plantas indicadoras não foram observados sintomas de virose. É evidente que *F. occidentalis* P. é o responsável pela transmissão dos vírus analisados neste estudo em cebola cultivada. Não há relatórios anteriores sobre a detecção de Orthotospovirus, Potyvirus e Carlavirus em cebola na Baja California.

**Palavras chave:** Orthotospovirus, IYSV, LYSV, Trips, TSWV.

## Introducción

Las enfermedades virales ocasionan pérdidas económicas en la producción de diferentes cultivos en México (Pérez *et al.*, 2010; Samaniego *et al.*, 2017). En especies del género *Allium* los virus pueden ocasionar distintas enfermedades (Pérez *et al.*, 2010). La cebolla (*Allium cepa* L.) es un cultivo importante para México debido a su demanda alimenticia, generación de empleos y divisas. Durante 2019 en Baja California (BC) se sembraron 6.300 ha de cebolla, con un rendimiento total de más de 118.599 t (SIAP, 2020). Sin embargo, a pesar de su importancia, en BC no existe información sobre la detección e impacto de agentes virales en el desarrollo y rendimiento de las variedades cultivadas. Desde el 2011 se han venido observando, en plantaciones de distintas variedades de cebolla en BC, síntomas típicos

## Introduction

The viral diseases produce economic losses in the production of different crops in Mexico (Pérez *et al.*, 2010; Samaniego *et al.*, 2017). In species of the genus *Allium*, viruses can cause several diseases (Pérez *et al.*, 2010). The onion (*Allium cepa* L.) is an important crop for Mexico, due to its food demand, generation of jobs and foreign exchange. During 2019 in Baja California (BC) 6,300 ha of onion were sown, with a total yield of more than 118,599 t (SIAP, 2020). However, despite its importance, in BC there is no information about the detection and impact of viral agents on the development and yield of cultivated varieties. Since 2011, typical symptoms associated to viruses as, dwarfism, yellow bands and yellow spots on leaves, have been observed in plantations of different varieties of onion in BC, which are related to the

asociados a virus como enanismos, bandeados amarillos y manchas amarillas en hojas, los cuales se relacionan con la reducción del calibre del bulbo. Asimismo, se observó la presencia de trips (*F. occidentalis* P.) e insectos vectores de orthotospovirus en diferentes cultivos de importancia económica mundial (Mound, 2005). Esta sintomatología es similar a la ocasionada por el virus de la mancha amarilla del iris (IYSV; familia: *Tospoviridae*, género: *Orthotospovirus*), que ha causado pérdidas económicas considerables en cebolla en América y Europa (Bag y Pappu, 2009; Bag *et al.*, 2014). Por la importancia alimenticia y económica que representa el cultivo de cebolla, se requiere identificar a los patógenos asociados a enfermedades y generar información para realizar acciones fitosanitarias pertinentes. Al respecto, algunas técnicas como DAS-ELISA han sido exitosas para la detección de agentes causales de enfermedades virales (Hsu *et al.*, 2010; Ávila-Alistac *et al.*, 2017). Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue detectar la presencia de los virus que se encuentran tanto en plantas de cebolla, como en los insectos trips asociados al cultivo.

## Materiales y métodos

### Toma de muestras

El estudio se realizó en tres zonas productoras de cebolla del estado de BC, en su temporada de producción, siendo de diciembre de 2015 a febrero de 2016 en el Valle de Mexicali, y de enero a mayo de 2016 en La Trinidad

reducción de the size of the bulb. Also, the presence of thrips (*F. occidentalis* P.) and orthotospovirus vector insects was observed in different crops of world economic importance (Mound, 2005). This symptomatology is similar to the one caused by the Iris yellow spot virus (IYSV; family: *Tospoviridae*, genus: *Orthotospovirus*), which has produced considerable economic losses in onion in America and Europe (Bag and Pappu, 2009; Bag *et al.*, 2014). Due to the alimentary and economic importance that onion crop represents, is necessary to identify the pathogens associated to diseases and generate information to realize relevant phytosanitary actions. Regarding to the mentioned before, some techniques such as DAS-ELISA have been successful for the detection of causative agents of viral diseases (Hsu *et al.*, 2010; Ávila-Alistac *et al.*, 2017). The objective of this research was to detect the presence of viruses that are found both in onion plants and in the trips insects associated with the crop.

## Materials and methods

### Sampling

The study was carried out in three onion producing areas of BC State, on onion production season, being December 2015 to February 2016 in the Mexicali Valley, and from January to May 2016 in Trinidad and San Quintín. From 102 onion production units at the state level, 22 units were randomly sampled. Leaves tissue and onion pseudostem with viral symptoms (yellowing, mottling,

y San Quintín. De 102 unidades de producción de cebolla a nivel estatal, se muestrearon aleatoriamente 22 unidades. Se colectaron tejidos de hojas y pseudotallo de cebolla con síntomas virales (amarillamientos, moteados, mosaicos, enanismos, y deformación de hojas) y de plantas asintomáticas, siguiendo la metodología de Velásquez-Valle y Reveles-Hernández (2011). En los mismos sitios donde se colectaron las plantas de cebollas, se colectaron insectos trips en estado adulto con un hisopo y se colocaron en frascos de cristal conteniendo etanol al 70 %, hasta su procesamiento en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Ciencias Agrícolas-Universidad Autónoma de Baja California (ICA-UABC).

### Detección de virus por DAS-ELISA

Se utilizaron anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina (Agdia®) para detectar las proteínas de cubierta de IYSV, TSWV, LYSV, OYDV, y GarCLV (Clark y Adams, 1977). Los controles positivos y negativos fueron adquiridos de la misma compañía. La concentración relativa del virus (absorbancia) se obtuvo mediante lectura espectrofotométrica (Bioek Microplatescanning ELx800) con longitud de onda de 405 nm ( $A_{405}$ ). Se realizó un esquema que incluyó un duplicado para cada muestra, siendo positiva cuando el valor de absorbancia fue dos veces mayor a la media del control negativo (De la Torre *et al.*, 2002; Cervantes y Samaniego, 2012). Para el análisis de los trips, dos adultos fueron colocados por cada tubo de 2,0 ml, se maceraron con 50

mosaic, dwarfism, and leaves deformation) and asymptomatic plants were collected, following the methodology of Velásquez-Valle and Reveles-Hernández (2011). At the same places where the plants of onion were recollected, thrip insects were collected in adult stage with a swab and placed in glass bottles containing 70% ethanol, until their processing in the Phytopathology Laboratory of the Institute of Agricultural Sciences-Autonomous University of Baja California (ICA-UABC).

### Virus detection by DAS-ELISA

Alkaline phosphatase-conjugated antibodies (Agdia®) were used to detect the coat proteins of IYSV, TSWV, LYSV, OYDV, and GarCLV (Clark and Adams, 1977). The positive and negative controls were acquired by the same company. The relative virus concentration (absorbance) was obtained by spectrophotometric reading (Bioek Microplatescanning ELx800) with a wavelength of 405 nm ( $A_{405}$ ). A diagram that included one duplicate for each sample was done, being positive when the absorbance value was twice higher than the mean of the negative control (De la Torre *et al.*, 2002; Cervantes and Samaniego, 2012). For the trips analysis, two adults were placed for each 2.0 ml tube, macerated with 50  $\mu$ L of extraction buffer (0.3 g of egg albumin, 0.195 g of anhydrous sodium sulfite, 3.0 g of polyvinylpyrrolidone, 0.03 g of anhydrous sodium azide, 3 mL of polyethylene sorbitan monolaurate, 1X PBSt wash buffer, pH = 7.4), and absorbance was evaluated to determine negative or positive samples

$\mu\text{L}$  de amortiguador de extracción (0,3 g de albúmina de huevo, 0,195 g de sulfito de sodio anhidro, 3,0 g de polivinilpirrolidona, 0,03 g de ázida de sodio anhidro, 3 mL de monolaurato de polietilenosorbitán, Amortiguador de lavado PBSt 1X,  $\text{pH}=7,4$ ), y se evaluó la absorbancia para determinar muestras negativas o positivas a los virus estudiados (Srinivasan *et al.*, 2012; Bag *et al.*, 2014).

### Plantas indicadoras

Las pruebas de transmisión se realizaron por duplicado, en el invernadero de Fitopatología del ICA-UABC, con semillas libres de virus, donadas por el Dr. Daniel Leobardo Ochoa Martínez (Colegio de Posgraduados, Montecillo, México). Las especies utilizadas fueron: *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa*, *Datura stramonium*, *D. metel*, *Solanum lycopersicum*, *Physalis ixocarpa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Nicandra physaloides* y *Cucurbita pepo*. Las plantas fueron inoculadas mecánicamente siguiendo el protocolo descrito por De la Torre *et al.* (2002), mantenidas en invernadero de 25-30 °C y con tres repeticiones por especie, por prueba. Se observaron cada 24 horas durante 21 días después de la inoculación mecánica.

### Montaje e identificación de trips

Los trips colectados (50 adultos por sitio de muestreo) fueron montados e identificados con base en sus características morfológicas (Mound y Nakahara, 1993; Johansen y Mojica-Guzmán, 2009). El procesamiento se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del ICA-UABC siguiendo el protocolo

for the viruses studied (Srinivasan *et al.*, 2012; Bag *et al.*, 2014).

### Indicator plants

The transmission tests were made by duplicate, at the Plant Pathology greenhouse of ICA-UABC, with seeds free of virus, donated by the Dr. Daniel Leobardo Ochoa Martínez (Postgraduate College, Montecillo, Mexico). The species used were: *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa*, *Datura stramonium*, *D. metel*, *Solanum lycopersicum*, *Physalis ixocarpa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Nicandra physaloides* and *Cucurbita pepo*. The plants were mechanically inoculated following the protocol described by De la Torre *et al.* (2002), and were maintained in a greenhouse at 25-30 °C, and with three repetitions per specie, per test. They were observed every 24 hours during 21 days after the mechanical inoculation.

### Assembly and identification of thrips

The thrips collected (50 adults per place of sampling) were assembled and identified based on their morphological characteristics (Mound and Nakahara, 1993; Johansen and Mojica-Guzmán, 2009). The processing was carried out at the Phytopathology Laboratory of ICA-UABC following the protocol of Johansen and Mojica-Guzmán (2009). Later, with entomological needles the insects placed in a ventral position on a drop of glycerol, with wings, legs and antenna extended, were observed under the optical microscope for their identification according to taxonomic keys (Lacasa and Llorens, 1996; Mound and Nakahara, 1993).

de Johansen y Mojica-Guzmán (2009). Posteriormente, con agujas entomológicas los insectos colocados en posición ventral sobre una gota de glicerol, con alas, patas y antenas extendidas, y cubreobjetos, fueron observados al microscopio óptico para su identificación de acuerdo con claves taxonómicas (Lacasa y Llorens, 1996; Mound y Nakahara, 1993). La confirmación de resultados fue realizada por el Dr. Roberto Miguel Johansen Naime en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

## Resultados y discusión

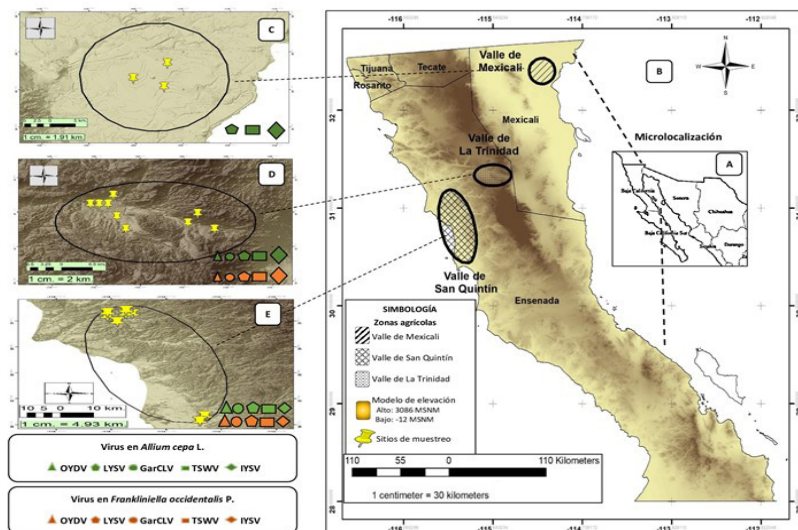
La presencia de síntomas virales en hojas se observó en los 22 sitios de colección de muestras en las parcelas de cebolla ubicadas en regiones agrícolas del estado de BC (figura 1). Se obtuvieron en total 44 muestras (dos por sitio), de las cuales 22 fueron de plantas sintomáticas y 22 fueron de plantas asintomáticas. El 55 % del total de muestras colectadas fueron del Valle de la Trinidad, el 36 % del Valle de San Quintín y el 9 % del Valle de Mexicali. Particularmente, en los Valles de la Trinidad y San Quintín se detectó la presencia de los cinco virus analizados (IYSV, TSWV, LYSV, OYDV y GarCLV), en diferentes proporciones, tanto en plantas de cebollas sintomáticas como en insectos trips (figura 1). En contraste, ni en las muestras de plantas asintomáticas, ni en los trips, se detectó la presencia de los virus analizados en este estudio. Sin embargo, en el Valle de Mexicali solamente se detectó la presencia de LYSV, IYSV y TSWV en plantas de cebollas sintomáticas (figura 1).

The confirmation of the results was realized by the. Dr. Roberto Miguel Johansen Naime, at the Institute of Biology of the National Autonomous University of Mexico (UNAM).

## Results and discussion

The presence of viral symptoms on leaves was observed at the 22 places of samples collection, in onion plots located in agricultural regions of the BC State (figure 1). A total of 44 samples were obtained (two per site), of which 22 were from symptomatic plants and 22 were from asymptomatic plants. The 55 % of the total collected samples were from The Trinidad Valley, the 36 % from the San Quintín Valley and the 9 % from the Mexicali Valley. Particularly, in the Trinidad and San Quintín valleys the presence of five viruses analyzed (IYSV, TSWV, LYSV, OYDV and GarCLV) was detected, in different proportions, both in symptomatic onion plants and in thrips insects (figure 1). In contrast, neither in the samples of asymptomatic plants, nor in the thrips, was detected the presence of the viruses analyzed in this study. However, in the Mexicali Valley the presence of LYSV, IYSV and TSWV was only detected in symptomatic onion plants (figure 1).

It has been pointed out that the presence of viruses in onion and garlic crops may vary, even in nearby agricultural regions (Pérez *et al.*, 2010; Velásquez-Valle and Reveles-Hernández, 2011; Ávila-Alistac *et al.*, 2017). This phenomenon can occur due to diversity and frequency



**Figura 1. Presencia de virus fitopatógenos en cebollas y trips en Baja California, México.** A) Noroeste de México; B) Regiones agrícolas en Baja California; C) Valle de Mexicali; D) Valle de la Trinidad; E) Valle de San Quintín; IYSV: Virus de la mancha amarilla del iris; TSWV: Virus de la marchitez manchada del tomate; LYSV: Virus del rayado amarillo del puerro; OYDV: Virus del enanismo amarillo de la cebolla, y GarCLV: Virus latente común del ajo.

**Figure 1. Presence of phytopathogenic viruses in onions and thrips, in Baja California, Mexico.** A) Northwest of Mexico; B) Agricultural regions in Baja California; C) Mexicali Valley; D) Trinidad Valley; E) San Quintín Valley; IYSV: Iris yellow spot virus; TSWV: Tomato spotted wilt virus; LYSV.

Se ha señalado que la presencia de virus en cultivos de cebolla y ajo puede variar, incluso entre regiones agrícolas cercanas (Pérez *et al.*, 2010; Velásquez-Valle y Reveles-Hernández, 2011; Ávila-Alistac *et al.*, 2017). Dicho fenómeno puede ocurrir debido a la diversidad y frecuencia de arvenses, presencia y fluctuaciones en las poblaciones de insectos vectores,

of weeds, presence and fluctuations in vector insect populations, and genetic material used to propagate the crop (Velásquez-Valle and Reveles-Hernández, 2011; Ávila-Alistac *et al.*, 2017). In BC, the onion crop is realized in monoculture in the regions of Trinidad and San Quintín Valleys, with open-air sowing and subsequent transplantation; while in the Mexicali



y material genético usado para propagar el cultivo (Velásquez-Valle y Reveles-Hernández, 2011; Ávila-Alistac *et al.*, 2017). En BC, el cultivo de cebolla se realiza en monocultivo en las regiones de los Valles de la Trinidad y San Quintín con siembra en almácigo a cielo abierto y posterior trasplante; mientras que en el Valle de Mexicali su siembra se realiza de manera directa. Es notorio que en el Valle de Mexicali la incidencia viral en plantas es menor, comparada con las otras regiones agrícolas de BC, aunado a ello, no se detectaron los virus analizados en adultos de trips. Posiblemente, el manejo del cultivo implementado por los productores en esa región agrícola, disminuye los riesgos de reservorios virales que pudieran infectar los cultivos. Aunado a ello, la carga viral presente en trips y detectable por DAS-ELISA pudo ser insuficiente, como lo reportado en otros estudios (Ávila-Alistac *et al.*, 2017). Los síntomas observados en los cultivos de cebolla fueron amarillamientos y lesiones cloróticas en hojas (figura 2A), en forma redonda o alargada (rombos o husos) con centros verdes rodeadas por halos necróticos, que en ocasiones adquieren tonos blancos o amarillo pálido, mosaicos, deformación de hojas y bulbos con tamaños reducidos (figura 2B, 2C y 2D). En las zonas donde se observaron estos síntomas, se presentaron reducciones en el calibre del bulbo.

Para disminuir la sintomatología en cebolla cultivada, los productores implementan medidas de control, como rotación de cultivos y eliminación del material vegetal afectado. Estas

Valley its sowing is done directly. It is notorious, that in the Mexicali Valley the viral incidence in plants is lower, compared to the other agricultural regions of BC, in addition, the viruses analyzed were not detected in adult thrips. Possibly, the management of the implemented crop by the producers in that agricultural region decreases the risks of viral reservoirs that could infect crops. In addition to this, the viral load present in thrips and detectable by DAS-ELISA could be insufficient, as reported in other studies (Ávila-Alistac *et al.*, 2017). The symptoms observed in onion crops were yellowing and chlorotic lesions on leaves (figure 2A), round or elongated (rhombus or spindles) with green centers surrounded by necrotic halos, which sometimes acquire white or pale yellow, mosaic, deformation of leaves and bulbs with reduced sizes (figure 2B, 2C and 2D). In the areas where these symptoms were observed, there were reductions in the size of the bulb.

To decrease symptomatology in cultivated onion, the producers apply control premises, such as crop rotations and removal of affected plant material. These practices coincide with the management for the control of IYSV implemented in other regions of the world, where producers, in addition to crop rotation, establish control programs for weeds and vector insects (Bag *et al.*, 2014; Ávila-Alistac *et al.*, 2017).

The results obtained in this study indicate that the viral incidence occurs in the form of co-infections in 77% of the samples. This result suggests that



prácticas coinciden con el manejo para el control de IYSV implementado en otras regiones del mundo, donde los productores además de la rotación del cultivo, establecen programas de control de arvenses e insectos vectores (Bag *et al.*, 2014; Ávila-Alistac *et al.*, 2017).

is not possible associate a particular symptomatology to a specific viral agent. This phenomenon coincide with the reported by several authors, who detected viral complexes in *A. cepa*, that naturally co-exist, originating the so-called “onion mosaics”, with different species of the *Orthotospovirus*,



**Figura 2. Síntomas ocasionados por virus en el cultivo de cebolla.** Amarillamientos y lesiones cloróticas en hojas (A y B), en forma redonda o alargada (como rombos o husos) con centros verdes rodeadas por halos necróticos, tonos amarillo pálido, deformación de hojas y bulbos con tamaños reducidos (C y D).

**Figure 2. Symptoms caused by viruses in onion crops.** Yellowing and chlorotic lesions on leaves (A and B), round or elongated form (such as rhombus or spindles) with green centers surrounded by necrotic halos, pale yellow tones, deformation of leaves and bulbs with reduced sizes (C and D).

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la incidencia viral se presenta en forma de coinfecciones en el 77 % de las muestras. Este resultado sugiere que no es posible asociar una sintomatología particular a un agente viral específico. Dicho fenómeno coincide con lo reportado por diversos autores, quienes detectaron en *A. cepa*, complejos virales que coexisten de manera natural, originando los denominados “mosaicos de cebolla” siendo distintas especies de los géneros *Orthotospovirus*, *Potyvirus* y *Carlavirus* las causantes de esta infección (Loebenstein y Lecoq, 2012; Velásquez-Valle *et al.*,

*Potyvirus* and *Carlavirus* genera causative of this infection (Loebenstein and Lecoq, 2012; Velásquez-Valle *et al.*, 2012). Also, is mentioned that only one virus or one viral complex can cause a similar symptomatology, although, there are differences related to the physiological state of the crop, the virus-cultivar relationship and the environmental temperature (Pérez *et al.*, 2010; Cervantes and Samaniego, 2012). In this study, the most frequent co-infections were: IYSV- TSWV- LYSV-GarCLV (41 %), LYSV-TSWV (17 %) e IYSV- LYSV-TSWV (11 %). The mentioned before, proposes the possibility that

2012). Además, se menciona que un solo virus o un complejo viral pueden ocasionar una sintomatología similar, aun cuando existan diferencias relacionadas con el estado fisiológico del cultivo, la relación virus-cultivar y la temperatura ambiental (Pérez *et al.*, 2010; Cervantes y Samaniego, 2012). En este estudio, las coinfecciones más frecuentes fueron IYSV-TSWV-LYSV-GarCLV (41 %), IYSV-TSWV (17 %) e IYSV-LYSV-TSWV (11 %). Lo anterior plantea la posibilidad de que el manejo del cultivo, los residuos de cosechas y arvenses perennes aledañas puedan promover la formación de complejos virales que interactúan y se replican en las plantas cultivadas. Asimismo, la presencia de IYSV en coinfección y de forma individual fue detectada en el 95 % de las muestras sintomáticas, lo cual sugiere que IYSV es la especie más prevalente en las áreas de producción de cebolla en BC. Diversos estudios mencionan que los potyvirus IYSV y OYDV, y varias especies del género *Allexivirus* (GarV-A, B, C, D y X), son los patógenos virales más extendidos a nivel mundial en los cultivos del género *Allium* (Pérez *et al.*, 2010).

#### Detección de Orthotospovirus

En las regiones productoras de cebolla, se observaron síntomas que coincidían con la sintomatología asociada a IYSV (figura 1 y 2) y reportada en estudios previos a nivel mundial (Bag *et al.*, 2014). Particularmente, en el Valle de Mexicali, las plantas con síntomas fueron positivas a IYSV y TSWV (cuadro 1). Torres *et al.* (2017), detectaron previamente IYSV y TSWV

the management of the crop, harvest residues, and neighboring perennial weeds can promote the formation of viral complexes that interact and replicate in cultivated plants. Also, the presence of IYSV in coinfection and individual form was detected in 95% of the asymptomatic samples, which suggests IYSV as the most prevalent specie in onion production areas of BC. Different studies mention that IYSV and OYDV potyvirus, and several species of genus *Allexivirus* (GarV-A, B, C, D y X), are the most widespread viral pathogens worldwide in crops of genus *Allium* (Pérez *et al.*, 2010).

#### Detection of Orthotospovirus

In onion-producing regions, symptoms that coincided with the symptomatology associated with IYSV were observed (figures 1 and 2) and reported in previous studies worldwide (Bag *et al.*, 2014). Particularly, in the Mexicali Valley, the plants with symptoms were positive for IYSV and TSWV (table 1). Torres *et al.* (2017), previously detected IYSV and TSWV in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) in the same agricultural region. Likewise, in the samples obtained from the tours carried out in the Trinidad Valley, the presence of IYSV (25%) and TSWV (58 %) was determined in onion plants evaluated in that area (table 2). Additionally, in the San Quintín Valley IYSV was detected in 88% of plants with symptoms. The above, with the reports of several authors that detected IYSV on onion-producing regions (Bag *et al.*, 2014; Velásquez-Valle and Reveles-Hernández, 2011).

en Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en la misma región agrícola. Asimismo, en las muestras obtenidas de los recorridos realizados en el Valle de la Trinidad, se determinó la presencia de IYSV (25 %) y TSWV (58 %) en plantas de cebolla evaluadas en esa zona (cuadro 2). Adicionalmente, en el Valle de San Quintín se detectó IYSV en el 88 % de plantas con síntomas. Lo anterior, coincide con los reportes de diversos autores que detectaron IYSV en regiones productoras de cebolla (Bag *et al.*, 2014; Velásquez-Valle y Reveles-Hernández, 2011).

It is important to stand out that, in San Quintin Valley, all the samples evaluated with symptoms were positive for TSWV (table 3), which coincides with Garzón *et al.* (2005), who detected TSWV in plantations of tomato in that agricultural region. Similarly, TSWV was reported in plants of onion in United States and Mexico. Possibly, the sources of inoculum in both regions are the crops where TSWV is endemic, the wide range of hosts present and populations of vector insects (Mullis *et al.*, 2004; Velásquez-Valle *et al.*, 2012).

**Cuadro 1. Detección de Orthotospovirus, Potyvirus y Carlavirus en cebolla (*A. cepa* L.) cultivada en Valle de Mexicali, Baja California, México, durante los meses de diciembre de 2015, enero y febrero de 2016.**

**Table 1. Detection of Orthotospovirus, Potyvirus and Carlavirus in onion (*A. cepa* L.) cultivated in Mexicali Valley, Baja California, Mexico during the months of December 2015, January and February 2016.**

Complejos virales	Positivos	Síntomas	Variedad
IYSV-TSWV-LYSV	2/2 <sup>&amp;</sup>	A-BTR; A-DH	Cirrus, Cristal
OYDV	0/2	A-BTR; A-DH	Cirrus, Cristal
GarCLV	0/2	A-BTR; A-DH	Cirrus, Cristal

IYSV: Virus de la mancha amarilla del iris; TSWV: Virus de la marchitez manchada del tomate; LYSV: Virus del rayado amarillo del puerro; OYDV: Virus del enanismo amarillo de la cebolla, y GarCLV: Virus latente común del ajo; &: Muestras positivas / Muestras analizadas; A: Amarillamientos; BTR: Bulbo de tamaño reducido; DH: Deformación de hojas.

IYSV: Iris yellow spot virus; TSWV: Tomato spotted wilt virus; LYSV: Leek yellow streak virus; OYDV: Onion yellow dwarf virus, and GarCLV: Garlic Common latent virus; &: Positive samples / Analyzed samples; A: Yellowings; BTR: Bulb reduced in size; DH: Deformation of leaves.

Es importante resaltar que, en el Valle de San Quintín, todas las muestras evaluadas con síntomas fueron positivas a TSWV (cuadro 3), lo cual coincide con Garzón *et al.* (2005),

**Detection of Potyvirus**

In the Mexicali Valley, the presence of LYSV was detected in all the samples collected with symptoms, the OYDV virus was not detected in

quienes detectaron en plantaciones de tomate en esa región agrícola a TSWV. Similarmente, TSWV fue reportado en plantas de cebolla en Estados Unidos, y en México. Posiblemente, las fuentes de inóculo en ambas regiones son los cultivos donde TSWV es endémico, el amplio rango de hospederos presentes y poblaciones de insectos vectores (Mullis *et al.*, 2004; Velásquez-Valle *et al.*, 2012).

any of the samples analyzed from that region (table 1). In contrast, in the Trinidad Valley the presence of LYSV (92 %) and OYDV (27 %) was detected. It is important to emphasize that in this region the viral incidence was presented in co-infections in 58 % of the samples, and in contrast, in 42 % of the plants analyzed only the presence of LYSV was detected (table 2). In the same way, in the San Quintín

**Cuadro 2. Detección de virus en cebolla (*A. cepa* L.) cultivada en el Valle de la Trinidad, Baja California, durante los meses de enero-mayo de 2016.**

**Table 2. Virus detection in onion (*A. cepa* L.) cultivated in Trinidad Valley, Baja California, during the months of January-May 2016.**

Virus	Positivos	Síntomas	Variiedad
IYSV-TSWV-LYSV-OYDV-GarCLV	1/12 <sup>&amp;</sup>	A, DH	Toluca
TSWV-LYSV-OYDV-GarCLV	1/12	A, DH	Mont Blanc
IYSV-TSWV-LYSV-GarCLV	1/12	CH, MB	Nube blanca
IYSV-TSWV-OYDV-GarCLV	1/12	MB	Toluca
TSWV-LYSV	3/12	MB, CH	Nube Blanca, Sierra Blanca, Sterling
LYSV	5/12	A, DH	Sierra Blanca, Sterling, Toluca, Mont Blanc, Orizaba

IYSV: Virus de la mancha amarilla del iris; TSWV: Virus de la marchitez manchada del tomate; LYSV: Virus del rayado amarillo del puerro; OYDV: Virus del enanismo amarillo de la cebolla, y GarCLV: Virus latente común del ajo;&: Muestras positivas / Muestras analizadas; A: Amarillamientos; BTR: Bulbo de tamaño reducido; CH: Clorosis en hojas; MB: Mosaico en forma de bandas; DH: Deformación de hoja.

IYSV: Iris yellow spot virus; TSWV: Tomato spotted wilt virus; LYSV: Leek yellow streak virus; OYDV: Onion yellow dwarf virus, and GarCLV: Garlic common latent virus; &: Positive samples / Analyzed samples; A: Yellowings; BTR: Bulb reduced in size; CH: Chlorosis on leaves; MB: Banded mosaic; DH: Leaf deformation.

**Detección de Potyvirus**

En el Valle de Mexicali, fue detectada la presencia de LYSV en todas las muestras colectadas con síntomas, no detectándose el virus

Valley, LYSV was detected in all the samples analyzed with symptoms. Additionally, the 12.5 % of the plants analyzed from this agricultural region were positive for OYDV (table 3).

OYDV en ninguna de las muestras analizadas de esa región (cuadro 1). En contraste, en el Valle de la Trinidad se detectó la presencia de LYSV (92 %) y OYDV (27 %). Es interesante destacar que en dicha región la incidencia viral se presentó en forma de coinfecciones en el 58 % de las muestras, y en contraste, en el 42 % de las plantas analizadas se detectó sólo la presencia de LYSV (cuadro 2). De la misma manera, en el Valle de San Quintín, se detectó a LYSV en todas las muestras analizadas con síntomas. Adicionalmente, fueron positivas a OYDV el 12,5 % de plantas analizadas procedentes de dicha región agrícola (cuadro 3).

The symptoms observed in BC, were similar to those reported in other regions of the world, where OYDV was identified in onion. In these plantations, the symptoms cause decrease in the length, weight of the plant, bulbs and in the number of leaves (Dovas *et al.*, 2001).

#### Detection of Carlavirus

Based on the results obtained, none sample collected in the Mexicali Valley was positive for GarCLV (table 1). In contrast, in the Trinidad Valley, it was detected in 33 % of the analyzed samples (table 2). All samples from the San Quintin Valley were positive for GarCLV, making it the region with the highest incidence

### Cuadro 3. Detección de complejos virales de Orthotospovirus, Potyvirus y Carlavirus en cebolla (*A. cepa* L.) cultivada en Valle de San Quintín, Baja California, México, durante los meses de enero-mayo de 2016.

Table 3. Detection of Orthotospovirus, Potyvirus and Carlavirus viral complexes in onion (*A. cepa* L.) cultivated in the San Quintin Valley, Baja California, Mexico, during the months of January-May 2016.

Complejos virales	Positivos	Síntomas	Variedad
IYSV-TSWV-LYSV-OYDV-GarCLV	1/8 <sup>&amp;</sup>	CH	Toluca
IYSV-TSWV-LYSV-GarCLV	6/8	A, MB, CH-BTR, CH-DH, MB-DH	Sterling, Mont Blanc, Papalote, Nube Blanca, Sierra Blanca
TSWV-LYSV- GarCLV	1/8	MB	Sierra Blanca

IYSV: Virus de la mancha amarilla del iris; TSWV: Virus de la marchitez manchada del tomate; LYSV: Virus del rayado amarillo del puerro; OYDV: Virus del enanismo amarillo de la cebolla, y GarCLV: Virus latente común del ajo; &: Muestras positivas / Muestras analizadas; A: Amarillamientos; BTR: Bulbo de tamaño reducido; CH: Clorosis en hojas; MB: Mosaico en forma de bandas; DH: Deformación de hoja.

IYSV: Iris yellow spot virus; TSWV: Tomato spotted wilt virus; LYSV: Leek yellow streak virus; OYDV: Onion yellow dwarf virus, and GarCLV: Garlic common latent virus; &: Positive samples / Analyzed samples; A: Yellowings; BTR: Bulb reduced in size; CH: Chlorosis on leaves; MB: Banded mosaic; DH: Leaf deformation.

Los síntomas observados en BC, fueron similares a los reportados en

of this virus in the state of BC (table 3). Similarly, Velásquez-Valle *et al.*

otras regiones del mundo donde se identificó OYDV en cebolla. En estas plantaciones, los síntomas ocasionan disminución en la longitud, peso de la planta y bulbos y en el número de hojas (Dovas *et al.*, 2001).

### Detección de Carlavirus

Con base en los resultados obtenidos, ninguna muestra colectada en el Valle de Mexicali fue positiva a GarCLV (cuadro 1). En contraste, en el Valle de la Trinidad, se detectó en el 33 % de muestras analizadas (cuadro 2). Todas las muestras procedentes del Valle de San Quintín fueron positivas a GarCLV, por lo cual fue la región con mayor incidencia de este virus en el estado de BC (cuadro 3). Similarmente, Velásquez-Valle *et al.* (2012) detectaron a GarCLV en cebolla en el estado de Zacatecas, México. Algunos autores mencionan que GarCLV puede no inducir síntomas perceptibles en las plantas, pero puede interactuar con uno o dos potyvirus y afectar el rendimiento del cultivo (Lot *et al.*, 1998).

### Detección de virus en plantas indicadoras

La inoculación mecánica de savia de plantas de cebolla positivas a los virus IYSV, TSWV, OYDV, LYSV y GarCLV no indujo síntomas en ninguna de las siete especies utilizadas como plantas indicadoras en este estudio. La expresión de síntomas virales en plantas indicadoras está influenciada por el período de incubación, cultivar utilizado, fenología y nivel de estrés en las plantas al momento de la infección, así como las condiciones climáticas (Bag *et al.*, 2012). Posiblemente el título viral de las plantas utilizadas en este estudio para la transmisión mecánica

(2012) detectó GarCLV en onion in the state of Zacatecas, México. Some authors mention that GarCLV may not induce noticeable symptoms in plants, but may interact with one or two potyvirus and affect crop yield (Lot *et al.*, 1998).

### Virus detection in indicator plants

Mechanical inoculation of sap from onion plants positive for IYSV, TSWV, OYDV, LYSV and GarCLV did not induce symptoms in any of the seven species used as indicator plants in this study. The expression of viral symptoms in indicator plants is influenced by incubation period, cultivar used, phenology and stress level in plants at the time of infection, as well as climatic conditions (Bag *et al.*, 2012). Possibly, the viral title of the plants used in this study for the mechanical transmission was insufficient to cause the development of symptoms. In this sense, IYSV was reported to have a mechanical transmission rate of 30 %, and caused some symptoms on indicator plants, except on *Nicotiana benthamiana* and *Eustoma russellianum* (Bag and Pappu, 2009; Bag *et al.*, 2014; Bag *et al.*, 2015). In the same way, the incubation period of the infection caused by IYSV and the expression of symptoms could be up to 30 days or more (Hsu *et al.*, 2010). Also, Ornelas-Ocampo *et al.* (2018), found a genetic diversity in IYSV isolations, which cause symptoms in *N. benthamiana* but with different severity, due to the differences in environmental conditions. In addition, De la Torre *et al.* (2002) indicate that



fue insuficiente para ocasionar el desarrollo de síntomas. En este sentido, se reportó que IYSV presentó una tasa de transmisión de manera mecánica del 30 %, y ocasionó algunos síntomas en plantas indicadoras, excepto en *Nicotiana benthamiana* y en *Eustoma russellianum* (Bag y Pappu, 2009; Bag *et al.*, 2014; Bag *et al.*, 2015). De la misma manera, el período de incubación de la infección ocasionada por IYSV y la expresión de síntomas podría ser de hasta 30 días o más (Hsu *et al.*, 2010). Además, Ornelas-Ocampo *et al.* (2018), encontraron una diversidad genética en aislamientos de IYSV que ocasionaron síntomas en *N. benthamiana* pero con diferente severidad, debido a diferencias en condiciones ambientales. Aunado a lo anterior, De la Torre *et al.* (2002), indican que cuando se reproducen síntomas por TSWV en plantas indicadoras, estos pueden ser frecuentemente diferentes a los observados en campo.

### Detección de virus en trips

Las muestras de ejemplares adultos de trips encontrados durante los recorridos en cultivos de cebolla en los Valles de Mexicali, de la Trinidad y de San Quintín, mostraron la cabeza más ancha que larga, antenas moniliformes formadas por ocho artejos, los dos últimos son pequeños, y con el segmento VIII mucho más largo que el VII y cuatro alas angostas con flecos en sus bordes posteriores (figura 3 A-C). Con base en Lacasa y Llorens (1996) y Mound y Nakahara (1993), se utilizaron los descriptores para el género *Frankliniella* y de acuerdo con los caracteres observados, se describió a la especie *F. occidentalis* P. presente en las muestras de todos los sitios evaluados.

when TSWV symptoms are reproduced in indicator plants, they can often be different from those observed in the field.

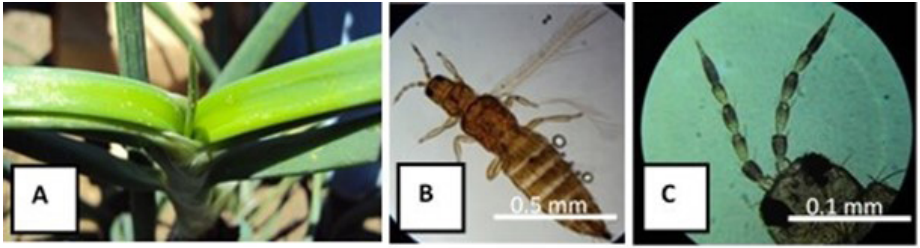
### Virus detection in thrips

The samples of adult thrips specimens found during the tours in onion crops in the Mexicali, La Trinidad and San Quintín Valleys showed a head wider than long, moniliform antennae formed by eight artifacts, the last two being small, and with segment VIII much longer than segment VII and four narrow wings with bangs on their posterior edges (figure 3 A-C). Based on Lacasa and Llorens (1996) and Mound and Nakahara (1993), the descriptors for the genus *Frankliniella* were used and according to the characters observed, the specie *F. occidentalis* P. present in the samples from all the sites evaluated was described.

The thrip samples collected in the Mexicali Valley resulted negative for the presence of virus evaluated. However, in plants of onion the viruses TSWV, IYSV, and LYSV were detected (table 1 and 4).

In this sense, it is mentioned that TSWV and IYSV are localized viruses, so their distribution on the plant is heterogeneous (De la Torre *et al.*, 2002; Avila-Alistac *et al.*, 2017). Also, *F. occidentalis* P. and *Trips tabaci* Lind have been reported with high efficiencies in their transmission, TSWV and IYSV vectors, respectively (De la Torre *et al.*, 2002; Gent *et al.*, 2006). However, transovarial transmission of TSWV and IYSV does not occur in their vectors, therefore, individuals of each generation must





**Figura 3. Presencia de insectos trips (*Frankliniella occidentalis* P.) en hojas de cebolla. (A) vista dorsal de adulto de *F. occidentalis* P.; (B) cabeza vista dorsal de adulto de *F. occidentalis* P.; (C) Campo óptico (40x).**

**Figure 3. Presence of thrip insects (*Frankliniella occidentalis* P.) on onion leaves. (A) adult dorsal view of *F. occidentalis* P.; (B) adult dorsal view head of *F. occidentalis* P.; (C). Optical field (40x).**

Las muestras de trips colectadas en el Valle de Mexicali resultaron negativas a la presencia de los virus evaluados. Sin embargo, en las plantas de cebolla se detectaron los virus TSWV, IYSV, y LYSV (cuadro 1 y 4).

En este sentido, se menciona que TSWV e IYSV son virus localizados, por lo que su distribución en la planta es heterogénea (De la Torre *et al.*, 2002; Ávila-Alistac *et al.*, 2017). Además, se han reportado con altas eficiencias en su transmisión, a *F. occidentalis* P. y *Trips tabaci* Lind., vectores de TSWV e IYSV, respectivamente (De la Torre *et al.*, 2002; Gent *et al.*, 2006). Sin embargo, no ocurre transmisión transovárica de TSWV e IYSV en sus vectores, por lo tanto, los individuos de cada generación deben adquirir el virus de una planta infectada para poder transmitirlo (van de Wetering *et al.*, 1996; Ávila-Alistac *et al.*, 2017). *F. occidentalis* P.

acquire the virus from an infected plant in order to transmit it (van de Wetering *et al.*, 1996; Ávila-Alistac *et al.*, 2017). *F. occidentalis* has a greater susceptibility to the acquisition of TSWV during the first instar larval stage; once acquired; the feeding habits of *F. occidentalis* P. are altered, leading to more efficient spread of TSWV (He *et al.*, 2019). Possibly, the individuals sampled in this study, had not fed in immature stages on infected hosts, which made virus detection in adults difficult. Nowadays, there is no evidence of the TSWV and IYSV transmission by seed, but they have been detected in onion plantations (Velásquez-Valle *et al.*, 2012; Ávila-Alistac *et al.*, 2017). It would be interesting to determinate in future studies, if the inoculum sources, could be reservoirs in weeds, or even infected genetic material. Similarly, some studies mention to *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae)

**Cuadro 4. Presencia de virus en adultos de *F. occidentalis* P. colectados en plantaciones de cebolla en los Valles de Mexicali, de la Trinidad y San Quintín durante los meses de diciembre de 2015, enero-mayo de 2016.**

**Table 4. Viruses presence in adults of *F. occidentalis* P collected in onion plantations in the Mexicali, La Trinidad and San Quintín Valleys, during the months of December 2015, January-May 2016.**

Región agrícola	Complejo viral	
	TSWV-GarCLV	TSWV-IYSV-OYDV -LYSV-GarCLV
Valle de Mexicali	0/2 <sup>z</sup>	0/2 <sup>z</sup>
V. de la Trinidad	4/12	1/12
V. de San Quintín	7/8	1/8

z: Muestras de trips positivas/ Muestras analizadas; IYSV: Virus de la mancha amarilla del iris; TSWV: Virus de la marchitez manchada del tomate; LYSV: Virus del rayado amarillo del puerro; OYDV: Virus del enanismo amarillo de la cebolla; GarCLV: Virus latente común del ajo.

z: Thrips samples positive/ Analyzed Samples; IYSV: Iris yellow spot virus; TSWV: Tomato spotted wilt virus; LYSV: Leek yellow streak virus; OYDV: Onion yellow dwarf virus; GarCLV: Garlic common latent virus.

tiene una mayor susceptibilidad a la adquisición de TSWV durante el primer instar de estadio larval; una vez adquirido, los hábitos alimenticios de *F. occidentalis* P. se alteran, lo que conduce a una propagación más eficiente de TSWV (He *et al.*, 2019). Posiblemente los individuos muestreados en este estudio, no se habían alimentado en estadios inmaduros de hospedantes infectados, lo que dificultó la detección de virus en adultos. Actualmente, no hay evidencia de la transmisión de TSWV e IYSV por semilla, pero si se han detectado en almácigos de cebolla (Velásquez-Valle *et al.*, 2012; Ávila-Alistac *et al.*, 2017). Sería interesante determinar en futuros estudios si las fuentes de inóculo pueden ser reservorios en arvenses, o incluso material genético

as a vector of the *Allexiviridae* and *Potyviridae* family (Van Dijk, 1993; Van Dijk *et al.*, 1991). However, *F. occidentalis* P. has not been reported as a vector of LYSV. In contrast, in agricultural regions of Trinidad and San Quintin, the presence of viral complexes in thrip adults was detected in onion crops (table 4). Particularly, of the samples collected in the Trinidad Valley from TSWV-positive onion plantations, 33% of the *F. occidentalis* specimens were positive for the TSWV-GarCLV complex (table 2 and 4). In the same way, 8% of the samples collected in the Trinidad Valley were positive to the IYSV-LYSV-OYDV complex (table 4). These results coincide with the report of Mullis *et al.* (2004), who found *F. occidentalis* in infected onion plants with IYSV-TSWV complex, in Georgia,

infectado. Similarmente, algunos estudios mencionan a *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) como vector de las familias *Allexiviridae* y *Potyviridae* (Van Dijk, 1993; Van Dijk *et al.*, 1991). Sin embargo, no se ha reportado como vector de LYSV a *F. occidentalis* P. En contraste, en las regiones agrícolas de la Trinidad y San Quintín, si se detectó la presencia de complejos virales en adultos de trips en cultivos de cebolla (cuadro 4). Particularmente, de las muestras colectadas en el Valle de la Trinidad en plantaciones de cebolla positivas a TSWV, el 33 % de los ejemplares de *F. occidentalis* fueron positivos al complejo TSWV-GarCLV (cuadro 2 y 4). De la misma manera, el 8 % de las muestras colectadas en el Valle de la Trinidad fueron positivas al complejo IYSV-LYSV-OYDV (cuadro 4). Estos resultados coinciden con el reporte de Mullis *et al.* (2004), quienes encontraron a *F. occidentalis* en plantas de cebolla infectadas con el complejo IYSV-TSWV, en Georgia, Estados Unidos. Similarmente, Velásquez-Valle y Reveles-Hernández (2011), identificaron ejemplares de *F. occidentalis* en cultivos de cebolla positivos a IYSV en Zacatecas, Mexico. Por otra parte, en el Valle de San Quintín, los resultados obtenidos indican que el 87,5 % de los adultos de *F. occidentalis* analizados portaban el complejo viral TSWV-GarCLV, y a su vez, el 12,5 % fueron positivos a IYSV-LYSV-OYDV (cuadro 4). Estos resultados sugieren que el Valle de San Quintín, es la región agrícola en

United States. Similarly, Velásquez-Valle and Reveles-Hernández (2011), identified specimens of *F. occidentalis* P. in onion crops positive for IYSV in Zacatecas, Mexico. On the other hand, in San Quintín Valley, the results obtained indicate that the 87,5 % of the *F. occidentalis* P. adults tested carried the TSWV-GarCLV viral complex, and 12.5% were positive for IYSV-LYSV-OYDV (table 4). These results suggest that San Quintín Valley, is the agricultural region in BC with the greater viral incidence in adults of *F. occidentalis* presented in onion crops, and that exist in biological and ecological conditions that favor the acquisition of viral particles by the insect. Studies mention that the TSWV has been detected in more than 650 species of cultivated, wild perennial and annual plants that are natural reservoirs and sources of primary inoculum of the virus, for its subsequent transmission by *F. occidentalis* P. (De la Torre *et al.*, 2002). Since TSWV had already been detected in the San Quintín Valley in tomato plantations (Garzón *et al.*, 2005; Holguín-Peña and Rueda-Puente, 2007; He *et al.*, 2019), the results obtained in this study suggest that TSWV is spreading to other crops through its insect vector *F. occidentalis* P. and that at least one crop, such as the onion, is being affected.

Recent studies mention that the adults of *F. occidentalis* P. are capable to migrate long distances and rapidly transmit viruses to cultivated and arborescent host plants (He *et al.*, 2019). In this sense, Ávila-Alistac *et al.* (2017) mention that the differences

BC con la mayor incidencia viral en adultos de *F. occidentalis* presentes en cultivos de cebolla, y que existen condiciones biológicas y ecológicas que favorecen la adquisición de las partículas virales por parte del insecto. Estudios mencionan que el TSWV se ha detectado en más de 650 especies de plantas cultivadas, silvestres perennes y anuales que son reservorios naturales y fuentes de inóculo primario del virus, para su posterior transmisión por *F. occidentalis* P. (De la Torre *et al.*, 2002). Debido a que TSWV ya había sido detectado en el Valle de San Quintín, en plantaciones de tomate (Garzón *et al.*, 2005; Holguín-Peña y Rueda-Puente, 2007; He *et al.*, 2019), los resultados obtenidos en este estudio sugieren que dicho virus se está diseminando a otros cultivos, a través de su insecto vector *F. occidentalis* P. y que al menos existe un cultivo como lo es la cebolla, que está siendo afectado. Estudios recientes mencionan que adultos de *F. occidentalis* P. son capaces de migrar a largas distancias y transmitir rápidamente los virus a plantas hospedantes cultivadas y arvenses (He *et al.*, 2019). En este sentido, Ávila-Alistac *et al.* (2017) mencionan que las diferencias en intensidad de la enfermedad ocasionada por IYSV en cebolla puede deberse a la diversidad y frecuencia de arvenses en las regiones productoras, que ocasionan diferencias en las poblaciones de insectos vectores. Sin embargo, algunos estudios mencionan que la propagación e impacto de IYSV

in the intensity of the disease caused by IYSV in onion may be due to the diversity and frequency of weeds in the producing regions, which cause differences in insect vector populations. However, some studies mention that the spread and impact of IYSV may be greater if conditions are present for the development of new outbreaks (Ornelas-Ocampo *et al.*, 2018). Finally, it is considered that the insect vector populations present in the crop fields, and that can efficiently transmit the viruses detected, are a threat to onion production in the state of BC. Timely detection of pathogens agents allows the establishment of appropriate integrated disease management programs. Epidemiological studies are needed to identify the effect of infections caused by virus complexes on yield and quality characteristics of the onion crop in BC.

## Conclusions

Through DAS-ELISA the presence of Iris yellow spot virus, Tomato spot wild virus, Leek yellow spot virus, Onion yellow spot virus and Garlic common latent virus was detected in onion crops of Baja California, México. The incidence in form of viral complexes was found in the 77 % of the samples, while in 23 % the simple infection caused by Leek yellow spot virus was detected. In the analysis of the insects collect in plots of onion, the specimens were identified as *F. occidentalis* P. and carriers of Iris yellow spot virus, Tomato spot wild virus, Leek yellow spot virus, Onion yellow spot virus and Garlic common

pueden ser mayores si se presentan las condiciones para el desarrollo de nuevos brotes (Ornelas-Ocampo *et al.*, 2018). Finalmente, se considera que poblaciones de insectos vectores presentes en los campos de cultivo, y que pueden transmitir de manera eficiente los virus detectados, son una amenaza para la producción de cebolla en el estado de BC. La detección oportuna de agentes patógenos permite el establecimiento de adecuados programas de manejo integrado de enfermedades. Estudios epidemiológicos son necesarios para identificar el efecto de las infecciones ocasionadas por complejos virales sobre el rendimiento y las características de calidad del cultivo de cebolla en BC.

## Conclusiones

Mediante DAS-ELISA se detectó la presencia de Iris yellow spot virus, Tomato spot wild virus, Leek yellow spot virus, Onion yellow spot virus y Garlic common latent virus en cultivos de cebolla en Baja California, México. La incidencia se encontró en forma de complejos virales en el 77 % de las muestras, mientras que en el 23 % fue detectada la infección simple ocasionada por Leek yellow spot virus. En el análisis de insectos colectados en parcelas de cebolla, los ejemplares fueron identificados como *F. occidentalis* P. y portadores de Iris yellow spot virus, Tomato spot wild virus, Leek yellow spot virus, Onion yellow spot virus y Garlic common latent virus. En este estudio, en las plantas indicadoras no se observaron los síntomas presentes

*latent virus*. In this study, the symptoms present in the field were not observed on indicator plants. To our knowledge, this is the first study of viral agents reported in onion (*A. cepa* L.) in Baja California, Mexico.

## Acknowledgments

To the National Council of Science and Technology for the funding granted. To the onion producers of the state of Baja California for sharing experiences and knowledge. To M.C. Carlos Ceceña Durán for his assistance in the Phytopathology Laboratory of ICA-UABC.

## End of English version

en campo. Hasta nuestro conocimiento, este es el primer estudio de agentes virales reportados en cebolla (*A. cepa* L.) en Baja California, México.

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado. A los productores de cebolla del estado de Baja California por compartir experiencias y conocimientos. Al M.C. Carlos Ceceña Durán por su asistencia en el Laboratorio de Fitopatología del ICA-UABC.

## Literatura citada

Ávila-Alistac, N., S. Ramírez-Rojas, H. Lozoya-Saldaña, A. Rebollar-Alviter y R.A. Guzmán-Plazola. 2017. Alternate hosts of Iris yellow spot virus and trips on onion crops in Morelos and Michoacan, Mexico. *Rev. Mex. Fitopatol.* 35:242-262.



- Bag, S y H.R. Pappu. 2009. Symptomatology of Iris yellow spot virus in selected indicator hosts. Plant Health Progress Doi:10.1094/PHP-2009-0824-01-BR.
- Bag, S., H.F. Schwartz y H.R. Pappu. 2012. Identification and virus characterization of biologically distinct Iris yellow spot virus (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*), a serious pathogen of onion. Eur. J. Plant Pathol. 134:97-104.
- Bag, S., H.F. Schwartz, C.S. Cramer, M.J. Havey y H.R. Pappu. 2015. Iris yellow spot virus (*Tospovirus*: *Bunyaviridae*): from obscurity to research priority. Mol Plant Pathol. 16(3):224-237.
- Bag, S., S.I. Rondon, K.L. Druffel, D.G. Riley y H.R. Pappu. 2014. Seasonal dynamics of thrips (*Thrips tabaci*) (Thysanoptera: Thripidae) transmitters of Iris yellow spot virus: A serious viral pathogen of onion bulb and seed. Crops. J. Econ. Entomol. 107(1):75-82.
- Cervantes, D.L. y B.Y. Samaniego G. 2012. Manual de prácticas de fitopatología. Primera Edición. Universidad Autónoma de Baja California. 105 p.
- Clark, M.F. y A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. General Virol. 34(3):475-483.
- De la Torre, A.R., L. Cervantes, A.H. Hobbs y R. Valverde. 2002. Variación fenotípica de algunos aislamientos mexicanos del Virus de la Marchitez Manchada del Tomate (TSWV). Agrociencia. 36:211-221.
- Dovas, C.I., E. Hatziloukas, R. Salomon, E. Barg, Y. Shibolet y N.I. Katis. 2001. Incidence of viruses infecting *Allium* spp. in Greece. European J. Plant Pathol. 107:677-684.
- Garzón T., J.A., T.J. Celis A., S. Velarde F., J. Ceballos R., P. Barbosa J., C. Reyes M., J.L. Martínez C. y P. Sánchez P. y S. Hernández V. 2005. Detección de virus fitopatógenos en la región Centro-Norte del Pacífico Mexicano. Rev. Mex. Fitopatol. 23(3):238-245.
- Gent, D. H., L. J. du Toit, S. F. Fichtner, S. K. Mohan, H. R. Pappu y H. F. Schwartz. 2006. Iris yellow spot virus: an emerging threat to onion bulb and seed production. Plant Dis. 90:1468-1480.
- He, Z., J. F. Guo, S. R. Reitz, Z. R. Lei y S. Y. Wu. 2019. A global invasion by the thrips, *Frankliniella occidentalis*: current virus vector status and its management. Insect Sci. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12721>.
- Holguín-Peña, R. J. y E.O. Rueda-Puente. 2007. Detection of Tomato spotted wilt virus in Tomato in the Baja California Peninsula of Mexico. Plant Dis. 91(12):1682B.
- Hsu, C.L., C.A. Hoeting, M. Fuchs, A.M. Shelton y B. A. Nault. 2010. Temporal dynamics of iris yellow spot virus and its vector, *Thrips tabaci* Lind. (Thysanoptera: Thripidae), in seeded and transplanted onion fields. Environm. Entomol. 39(2):266-277.
- Johansen, R. M. y A. Mojica-Guzmán. 2009. A review of the Mexican *Frankliniella paricutinensis* species assemblage in the Intonsa group (Insecta, Thysanoptera: Thripidae), with description of a new species. Rev. Mex. Biodivers. 80:349- 356.
- Lacasa, P. A. y J. M. Llorens C. 1996. Trips y su control biológico (I). Alicante: Pisa Editores p. 38-79.
- Loebenstein, G. y H. Lecoq. 2012. Viruses and virus diseases of the vegetables in the Mediterranean Basin. Academic Press. Oxford p. 31-53.
- Lot, H., V. Chovelon, S. Souche y B. Delecalle. 1998. Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. Plant Dis. 82:1381-1385.
- Mound, L. A. 2005. Thysanoptera: diversity and interactions. Annual Rev. Entomol. 50:247-269.
- Mound, L. y S. Nakahara. 1993. The genus *Frankliniella* (Thysanoptera: Thripidae): character assessment at generic and specific levels. J. Pure Appl. Zool. 4:287-295.

- Mullis, S.W., D.B. Langston Jr., R.D. Gitaitis, J.L. Sherwood, D.G. Riley, A.N. Sparks, R.L. Torrance y M.J. Cook IV. 2004. First report of *Vidalia* onion (*Allium cepa*) naturally infected with *tomato spotted wilt virus* and *iris yellow spot virus* (Family *Bunyaviridae*, Genus *Tospovirus*) in Georgia. *Plant Dis.* 88:1285.
- Ornelas-Ocampo, K., D.L. Ochoa-Martínez, S. Aranda-Ocampo, S. Ramírez-Rojas y H. García-Ruiz. 2018. Variabilidad y síntomas causados por *Iris yellow spot virus* en *Nicotiana benthamiana*. *Rev. Mex. Fitopatol.* 36(1):131-140.
- Pérez, M.L., M.J. Navarro L., R. Ramírez M. y B. Mendoza C. 2010. Impacto e Identificación de Virus Fitopatógenos Sobre Rendimiento y Calidad del Ajo (*Allium sativum* L), en el Estado de Guanajuato, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 28(2):97-110.
- Samaniego, G.B.Y., A. Reyes R., O.A. Moreno V. y J.M. Tun S. 2017. Resistencia sistémica inducida contra virus fitopatógenos mediada por la inoculación con la rizobacteria *Bacillus* spp. *Rev. Protec. Veg.* 32(1):10-22.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2020. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap>. Fecha de consulta: agosto de 2020.
- Srinivasan, R., S. Sundaraj, H.R. Pappu, S. Diffie, D.G. Riley y R.D. Gitaitis. 2012. Transmission of *Iris yellow spot virus* by *Frankliniella fusca* and *Thrips tabaci*. *J. Econom. Entomol.* 105:40-47.
- Torres, B.A.I., A. Morales M., R.L. Grijalva C., L. Cervantes D. y F. Núñez R. 2017. Hierro foliar y acolchado plástico en *Capsicum chinense* Jacq. infectado con tospovirus. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 8(2):369-380.
- Van de Wetering, F., R. Goldbach y D. Peters. 1996. *Tomato spotted wilt tospovirus* ingestion by first instar larvae of *Frankliniella occidentalis* is a prerequisite for transmission. *Phytopathol.* 86:900-905.
- Van Dijk, P., M. Verbeek y L. Bos. 1991. Mite-borne virus isolates from cultivated allium species and their classification into two new rymoviruses in the family potyviridae. *Neth J Plant Pathol.* 97(6): 381-399.
- Van Dijk, P. 1993. Carlaviruses isolates from cultivated *Allium* sp. represent three viruses. *Nether. J. Plant Pathol.* 99:233-257.
- Velásquez-Valle, R., M. Reveles-Hernández y M. A. Amador-Ramírez. 2012. Distribución viral en plantas de cebolla (*Allium cepa* L.) asintomáticas. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 3(7):1425-1434.
- Velásquez-Valle, R. y M. Reveles-Hernández. 2011. *Iris yellow spot virus* detection in the onion cultivation of Zacatecas, Mexico. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 2(6):971-978.














## Cyclical response of maize populations versus base population and standard genotypes across environments

Respuesta cíclica de las poblaciones de maíz frente a la población base y los genotipos estándar en todos los entornos

Resposta cíclica de populações de milho versus população de base e genótipos padrão em ambientes

Mohammad Sajjad<sup>1</sup>, Naqib Ullah Khan<sup>1\*</sup>, Samrin Gul<sup>2</sup>,  
Shahid Ullah Khan<sup>3</sup>, Zarina Bibi<sup>4</sup>, Sardar Ali<sup>5</sup>, Sher Aslam  
Khan<sup>5</sup>, Naushad Ali<sup>5</sup>, Iqra Tahir<sup>1</sup>, Amina Habib<sup>6</sup> and Ijaz  
Hussain<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Breeding and Genetics, University of Agriculture, Peshawar, Pakistan. Email: (MS) muhammadsajjadsro@gmail.com, ; (NUK) nukmarwat@yahoo.com, . (IT) iqratahir\_94@hotmail.com, . <sup>2</sup>Department of Plant Breeding and Genetics, Lasbela University of Agriculture, Water and Marine Sciences (LUAWMS), Uthal, Balochistan, Pakistan. Email: samringulpbg@gmail.com, . <sup>3</sup>Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, University of Agriculture, Peshawar, Pakistan. Email: shahidkhanbiotech@gmail.com, . <sup>4</sup>Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Gomal University, Dera Ismail Khan, Pakistan. Email: bibizarina100@yahoo.com, . <sup>5</sup>Department of Plant Breeding and Genetics, University of Haripur, Haripur, Pakistan. Email: (SA) sardar\_buner@yahoo.com, ; (SAK) sheraslamqau@gmail.com, ; (NA) naushadturi@gmail.com, . <sup>6</sup>Department of Agricultural Chemistry, University of Agriculture, Peshawar, Pakistan. Email: (AH) aminakhanaup@gmail.com, . <sup>7</sup>Department of Horticulture, University of Haripur, Haripur, Pakistan. Email: ijazhorticulturist@gmail.com, .

### Abstract

Recurrent selection is a cyclical breeding procedure in which selection is made generation after generation, with a reunion of selected plants to produce a new population for the next cycle of selection. Maize (*Zea mays* L.) base population

Received el 17-09-2020 • Accepted 13-11-2020

\*Corresponding author. Email: nukmarwat@yahoo.com, nukmarwat@aup.edu.pk

'PSEV3' was developed by using selfed progeny recurrent selection in spring and summer crop seasons during 2014 to 2016. During Summer 2017, two improved maize populations [PSEV3-(S<sub>1</sub>)-C<sub>1</sub> and PSEV3-(S<sub>2</sub>)-C<sub>2</sub>], original genotype (PSEV3-C<sub>0</sub>) and three check varieties (two OPV - open-pollinated varieties - Azam and Jalal, and HV - hybrid variety - Kiramat) were assessed for silking and yield traits across four environments including two planting dates and two sites i.e., Cereal Crops Research Institute (CCRI), Pirsabak - Nowshera, and University of Agriculture (UAP), Peshawar, Pakistan. Genotypes and planting dates enunciated significant ( $p \leq 0.01$ ) differences for majority of the traits. Maize improved populations (C<sub>1</sub> and C<sub>2</sub>) enunciated comparable values with early flowering and least cob height compared to base population and check genotypes. On average, PSEV3-(S<sub>2</sub>)-C<sub>2</sub> was foremost and exhibited maximum mean values for yield traits with enhanced grain yield with optimum planting at CCRI, followed by PSEV3-(S<sub>1</sub>)-C<sub>1</sub>. Base population - C<sub>0</sub> and check genotypes were observed with delayed silking and least grain yield across the environments. Selfed progeny recurrent selection was established as an efficient breeding method in improving maize base populations.

**Keywords:** selfed progeny recurrent selection, base and improved populations, genotype by environment interaction, earliness and yield traits, *Zea mays* L.

## Resumen

La selección recurrente es un procedimiento de mejoramiento cíclico en el que la selección se realiza generación tras generación, con una reunión de plantas seleccionadas para producir una nueva población para el siguiente ciclo de selección. La población base de maíz (*Zea mays* L.) 'PSEV3' se desarrolló utilizando la selección recurrente de progenie autofecundada en las temporadas de cultivo de primavera y verano durante 2014 a 2016. Durante el verano de 2017, dos poblaciones de maíz mejoradas [PSEV3-(S<sub>1</sub>)-C<sub>1</sub> y PSEV3-(S<sub>2</sub>)-C<sub>2</sub>], el genotipo original (PSEV3-C<sub>0</sub>) y tres variedades de control (dos OPV - variedades de polinización abierta - Azam y Jalal, y HV - variedad híbrida - Kiramat) se evaluaron para determinar los rasgos de rendimiento y sedosidad en cuatro entornos, incluidos dos fechas de siembra y dos sitios, es decir, el Instituto de Investigación de Cultivos de Cereales (CCRI), Pirsabak - Nowshera, y la Universidad de Agricultura (UAP), Peshawar, Pakistán. Los genotipos y fechas de siembra enunciaron diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ) para la mayoría de los rasgos. Las poblaciones mejoradas de maíz (C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>) enunciaron valores comparables con floración temprana y menor altura de mazorca en comparación con la población base y los genotipos de control. En promedio, PSEV3-(S<sub>2</sub>)-C<sub>2</sub> fue el primero y exhibió valores medios máximos para los rasgos de rendimiento con rendimiento de grano mejorado con una siembra óptima en CCRI, seguido de PSEV3-(S<sub>1</sub>)-C<sub>1</sub>. Población base - Se observaron genotipos de C<sub>0</sub> y control con retraso en la formación de estigmas y menor rendimiento de grano en todos los

ambientes. La selección recurrente de la progenie autofecundada se estableció como un método de mejoramiento eficaz para mejorar las poblaciones base de maíz.

**Palabras clave:** selección recurrente de progenie autofecundada, poblaciones base y mejoradas, interacción genotipo por ambiente, rasgos de precocidad y rendimiento, *Zea mays* L.

## Resumo

A seleção recorrente é um procedimento de melhoramento cíclico no qual a seleção é feita geração após geração, com uma reunião das plantas selecionadas para produzir uma nova população para o próximo ciclo de seleção. A população base de milho (*Zea mays* L.) 'PSEV3' foi desenvolvida usando a seleção recorrente de progênie autofecundada nas safras de primavera e verão durante 2014 a 2016. Durante o verão de 2017, duas populações de milho melhoraram [PSEV3-(S<sub>1</sub>)-C<sub>1</sub> e PSEV3-(S<sub>2</sub>)-C<sub>2</sub>], genótipo original (PSEV3-C<sub>0</sub>) e três variedades de verificação (duas OPV - variedades de polinização aberta - Azam e Jalal, e HV - variedade híbrida - Kiramat) foram avaliados para características de sedimentação e produção em quatro ambientes, incluindo duas datas de plantio e dois locais, isto é, Cereal Crops Research Institute (CCRI), Pirsabak - Nowshera, e University of Agriculture (UAP), Peshawar, Paquistão. Genótipos e datas de plantio enunciaram diferenças significativas ( $p \leq 0,01$ ) para a maioria das características. Populações melhoradas de milho (C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>) enunciaram valores comparáveis com floração precoce e menor altura de espiga em comparação com a população de base e genótipos de verificação. Em média, PSEV3-(S<sub>2</sub>)-C<sub>2</sub> foi o primeiro e exibiu valores médios máximos para características de rendimento com maior rendimento de grãos com plantio ideal no CCRI, seguido por PSEV3-(S<sub>1</sub>)-C<sub>1</sub>. População base - genótipos C<sub>0</sub> e testemunha foram observados com silenciamento retardado e menor rendimento de grãos nos ambientes. A seleção recorrente de progênies autogestionadas foi estabelecida como um método de melhoramento eficiente para melhorar as populações de base de milho.

**Palavras-chave:** seleção recorrente de progênie autofecundada, populações de base e melhoradas, interação genótipo por ambiente, precocidade e características de produção, *Zea mays* L.

## Introduction

Maize (*Zea mays* L.) is the primary cereal crop extensively grown in tropical to temperate zones under irrigated and rainfed conditions within 50° N to 40° S latitude due to its spacious adaptability (Martin *et al.*, 2006; Ali *et al.*, 2020).

## Introducción

El maíz (*Zea mays* L.) es el principal cultivo de cereal que se cultiva de forma extensiva en zonas tropicales a templadas, bajo condiciones de riego y sequía, entre un rango de latitud de 50° N a 40° S debido a su amplia

Being the highest yielding cereal, maize achieved greater importance in combating the food demand of the increasing population worldwide (Khan *et al.*, 2018). In Pakistan, maize grain production was 6.826 million tones from an area of 1,374 million ha having mean yield of 4,968 kg.ha<sup>-1</sup> (Pakistan Economic Survey, 2018-2019).

Recurrent selection had been found as an efficient breeding procedure in maintaining genetic variability and improving breeding material. Being a cyclical process, recurrent selection comprising three major steps; family origination, appraisal, and combination of families (Guimaraes *et al.*, 2018; Sheikh *et al.*, 2019). In recurrent selection, improved populations S<sub>1</sub> and S<sub>2</sub> are believed to be more capable for further improvement (Ayiga-Aluba *et al.*, 2015), and the enviable genes are rapidly organized while adverse factors are purged during early selection in maize (Ali *et al.*, 2018; Sajjad *et al.*, 2020a, b). However, the efficiency of the recurrent selection depends on genetic background, traits heritability, and genes prevalence within maize original population (Sajjad *et al.*, 2016).

Recurrent selection strengthens the enviable genes for polygenic traits and genetically improve the maize germplasm resources (Sajjad *et al.*, 2020c). Genetic variability might be reduced due to inbreeding during the initial cycles, however, opportunities for selection are not tentative and boost again after selection in maize improved populations (Ali *et al.*, 2019; Sampoux *et al.*, 2020). Past studies reported a significant decrease in earliness and morphological traits such as days to

adaptabilidad (Martin *et al.*, 2006; Ali *et al.*, 2020). Siendo el cereal con el más alto rendimiento, el maíz alcanzó una mayor importancia al cubrir la demanda de alimentos de la creciente población mundial (Khan *et al.*, 2018). En Pakistán la producción del grano de maíz fue de 6.826 millones de toneladas por un área de 1.374 millones de hectáreas, teniendo un rendimiento medio de 4.968 kg.ha<sup>-1</sup> (Pakistan Economic Survey, 2018-2019).

La selección recurrente se ha encontrado como un procedimiento de mejoramiento eficaz para mantener la variabilidad genética y mejorar el material de reproducción. Siendo un proceso cíclico, la selección recurrente comprende tres pasos principales: origen de la familia, valoración y combinación de familias (Guimaraes *et al.*, 2018; Sheikh *et al.*, 2019). En la selección recurrente, se cree que las poblaciones mejoradas S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> son más capaces de seguir mejorando (Ayiga-Aluba *et al.*, 2015), y los genes deseables son rápidamente organizados, mientras los factores adversos son purgados durante la selección temprana en el maíz (Ali *et al.*, 2018; Sajjad *et al.*, 2020a, b). Sin embargo, la eficiencia de la selección recurrente depende de los antecedentes genéticos, la heredabilidad de los rasgos y la prevalencia de los genes en la población original de maíz (Sajjad *et al.*, 2016).

La selección recurrente fortalece los genes deseables para los rasgos poligénicos, y genéticamente mejora los recursos del germoplasma del maíz (Sajjad *et al.*, 2020c). La

male and female flowering, and plant and cob height, while enhancement in yield variables with in maize S<sub>1</sub> selection (Kolawole *et al.*, 2017). The S<sub>1</sub> recurrent selection exhibited significant positive response with higher grain yield in contrast to selfed and original genotypes in *Zea mays* L. (Sohail *et al.*, 2018).

In maize, the recurrent selection is mainly used for population improvement, and to recognize the best performing progenies after each selection cycle. On recurrent selection in maize, extensive studies were conducted and varied estimates were recorded due to different breeding material used, environments, and their interactions (Udo *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2019; Khamkoh *et al.*, 2019). In recurrent selection methods, two aims stay common i.e., to improve the genetic potential of original population, and sustainable genetic variation in the population to assist in enduring maize breeding program (Guimaraes *et al.*, 2018; Kolawole *et al.*, 2019).

Maize can be grown in a broad array of environments, nonetheless, its production is intensely persuaded by genotypes, environments (sites, crop seasons, and planting dates), and their interaction (GEI) (Ali *et al.*, 2017, 2020; Sajjad *et al.*, 2020a, b). The genotype is an individual's hereditary composition and its performance relies on the ecosystem in the surroundings (Ali *et al.*, 2018; Andorf *et al.*, 2019). Populations may perform differently in diverse environments and may perform well in one environment but not in the other (Ali *et al.*, 2017; Annor *et al.*, 2019). Breeders always expose the newly developed genotypes to

variabilidad genética puede reducirse debido a la endogamia durante los ciclos iniciales, sin embargo, las oportunidades para la selección no son provisionales y se potencian de nuevo tras la selección de poblaciones mejoradas de maíz (Ali *et al.*, 2019; Sampoux *et al.*, 2020). Estudios anteriores reportaron una significativa disminución en precocidad y rasgos morfológicos tales como los días para la floración masculina y femenina, y longitud de la planta y de la mazorca, mientras que se mejoran las variables de rendimiento en la selección S<sub>1</sub> de maíz (Kolawole *et al.*, 2017). La selección recurrente S<sub>1</sub> mostró una respuesta positiva significativa con un mayor rendimiento de grano en contraste con los genotipos autóctonos y originales en *Zea mays* L. (Sohail *et al.*, 2018).

En el maíz, la selección recurrente es utilizada principalmente para mejorar la población, y reconocer el mejor rendimiento de progenies después de cada ciclo de selección. En la selección recurrente en maíz, se llevaron a cabo estudios exhaustivos y se registraron estimaciones variadas debido a los diferentes materiales de reproducción utilizados, los ambientes y sus interacciones (Udo *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2019; Khamkoh *et al.*, 2019). En los métodos de selección recurrente, dos objetivos siguen siendo comunes: mejorar el potencial genético de la población original, y la variación genética sostenible en la población para ayudar en el programa de reproducción de maíz perdurable (Guimaraes *et al.*, 2018; Kolawole *et al.*, 2019).

an array of sites and crop seasons to determine the influence of environment on their recital. The genotype with less magnification by the existing climatic conditions is considered most desirable (Annor *et al.*, 2019).

Determination of a suitable site and planting date is very crucial for achieving the best response and high yield in maize (Ali *et al.*, 2020). Optimum and delayed sowing is one of the key ecological aspect which cause marvellous impressions on maize crop and its production. Maize with optimum planting can ensures greater growth which lead to enhanced grain yield (Sajjad *et al.*, 2020a, d). The second imperative feature is the maize genotype, and a significant improvement in grain yield can be expected if it is tied with optimum environmental conditions.

Genotypes interaction with environmental factors (GEI) i.e., sites, seasons, optimum and delayed sowing, and biotic and abiotic stresses are enormous challenges for the plant breeders, and these features are normally used as environments. Therefore, it is earnestly needed that how to shape the genotype with optimum environmental conditions to acquire the highest grain yield. Due to changed climatic conditions, it is direly needed to assess and revise the production technologies as to get the net maximum return from the crop. Consequently, this research was planned with the objective to evaluate the competency of two improved maize populations "PSEV3-(S<sub>1</sub>)-C<sub>1</sub> and PSEV3-(S<sub>2</sub>)-C<sub>2</sub>" in relationship with original population (C<sub>0</sub>) and three check genotypes (OPV

El maíz puede ser cultivado en una amplia gama de entornos, sin embargo, su producción está intensamente influenciada por genotipos y ambientes (lugares, temporadas de cultivo y fechas de siembra), y su interacción (GEI) (Ali *et al.*, 2017, 2020; Sajjad *et al.*, 2020a, b). El genotipo es la composición hereditaria de un individuo y su rendimiento depende del ecosistema del entorno (Ali *et al.*, 2018; Andorf *et al.*, 2019). Las poblaciones pueden tener un rendimiento diferente en diversos ambientes, pueden tener un buen rendimiento en un entorno, pero no en otro (Ali *et al.*, 2017; Annor *et al.*, 2019). Los reproductores siempre exponen los genotipos recién desarrollados a una serie de lugares y temporadas de cultivo para determinar la influencia del entorno en su rendimiento. El genotipo con menos alteraciones por las condiciones climáticas existentes se considera más deseable (Annor *et al.*, 2019).

La determinación de un lugar y una fecha de siembra adecuada es crucial para alcanzar la mejor respuesta y un alto rendimiento en el maíz (Ali *et al.*, 2020). Una siembra óptima y tardía es un aspecto ecológico clave, lo cual es determinante en el cultivo de maíz y su producción. El maíz con una siembra optima puede garantizar un mayor crecimiento, lo cual conduce a mejorar el rendimiento del grano (Sajjad *et al.*, 2020a, d). La segunda característica imprescindible es el genotipo del maíz, y se puede esperar una mejora significativa del rendimiento del grano si va unido a unas condiciones ambientales óptimas.



- Azam and Jalal, and HV - Kiramat) under different environments (sites and planting dates).

**Materials and methods**

**Development of breeding material**

Maize base population used in study was ‘PSEV3’ (a cross amid the local maize variety Azam and a single cross white hybrid CHSW - developed by International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Mexico. Two improved maize populations “PSEV3 (S<sub>1</sub>)-C<sub>1</sub> and PSEV3 (S<sub>2</sub>)-C<sub>2</sub>” were developed from the original population (PSEV3) using two cycles of selfed progeny recurrent selection (S<sub>1</sub> and S<sub>2</sub> lines) in five spring and summer crop seasons during 2014 to 2016 at CCRI, Pirsabak - Nowshera, Pakistan (table 1).

La interacción de genotipos con los factores ambientales (GEI) i.e., lugares, temporadas, siembra óptima y tardía, y el estrés biótico y abiótico son grandes retos para los reproductores de plantas, y estas características son normalmente utilizadas como entornos. Por lo tanto, se necesita encarecidamente cómo formar el genotipo con las condiciones ambientales óptimas para adquirir el mayor rendimiento de grano. Debido a los cambios de las condiciones climáticas, es necesario evaluar y revisar las tecnologías de producción para obtener el máximo rendimiento neto del cultivo. Por consiguiente, esta investigación se planteó el objetivo de evaluar la competencia entre dos poblaciones mejoradas de maíz «PSEV3-(S<sub>1</sub>)-C<sub>1</sub> y PSEV3-(S<sub>2</sub>)-C<sub>2</sub>» en relación con la población original (C<sub>0</sub>) y tres genotipos control (OPV:

**Table 1. Cyclical populations and check genotypes evaluated at CCRI and UAP.**

**Cuadro 1. Poblaciones cíclicas y genotipos control evaluados en el CCRI y UAP.**

Genotypes	Type	Plant height	Maturity	Pedigree
PSEV3-C <sub>0</sub>	OPP	Medium	Medium	Cross amid Azam and CHSW, CIMMYT
PSEV3-(S <sub>1</sub> )-C <sub>1</sub>	OPP	Medium	Medium	Obtained by recombination of S <sub>1</sub> reliable lines
PSEV3-(S <sub>2</sub> )-C <sub>2</sub>	OPP	Medium	Medium	Obtained by recombination of S <sub>2</sub> specific lines
Azam	OPV	Medium	Medium	Obtained by crossing Akbar with Vikram
Jalal	OPV	Tall	Medium	Obtained by crossing Azam with CHSW
Kiramat	HV	Medium	Medium	Obtained by crossing FRHW-20-4 with FRHW-22(F <sub>2</sub> )-5

OPP: Open-pollinated population, OPV: Open-pollinated variety, HV: Hybrid variety, Short: 90-130 cm, Medium: 131-170 cm, Tall: 171-210 cm.

OPP: Población de polinización abierta, OPV: Variedad de polinización abierta, HV: Variedad híbrida, Corta: 90-130 cm, Media: 131-170 cm, Alta: 171-210 cm.



## Sites, and experimental procedure

During summer crop season 2017, newly developed improved populations “PSEV3-(S<sub>1</sub>)-C<sub>1</sub> and PSEV3-(S<sub>2</sub>)-C<sub>2</sub>” were appraised in comparison with original population (PSEV3-C<sub>0</sub>), and three check cultivars (two OPV - Azam and Jalal, and HV - Kiramat) with optimum (July 05, 2017) and delayed (July 25, 2017) plantings at two sites i.e., a) CCRI, Pirsabak - Nowshera, Pakistan (positioned amid 32°N and 72°E latitude and longitude, respectively with 288 m altitude), and b) UAP, Peshawar, Pakistan (located amid 34°N and 71°E latitude and longitude, respectively with 350 m altitude). All the maize genotypes were having white flint shape seeds which developed at CCRI, Pirsabak - Nowshera, Pakistan. At CCRI, the soil was moderately calcareous and sandy loam with 7.7 pH, 0.34 % organic matter, 0.034 % nitrogen, 0.0029 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0.051 % K<sub>2</sub>O. However, at UAP the soil was alkaline in nature and silt clay loam with 7.8 pH, 0.81 % organic matter, 0.063 % nitrogen, 7.18 mg.kg<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, and 112 ppm K<sub>2</sub>O. Temperature mean data during the months of the trials at both experimental sites is presented in figure 1.

At each site, the split-plot design was used for the experimental layout with three replications. Planting dates were treated as main-plots whereas maize genotypes were considered as sub plots at both sites. Each sub plot comprising four rows with five meters length, and 0.75 and 0.25 m rows and plants spacing, respectively.

Azam y Jalal, y HV: Kiramat) bajo diferentes ambientes (lugares y fechas de siembra).

## Materiales y métodos

### Desarrollo del material de reproducción

La población base de maíz utilizada en este estudio fue ‘PSEV3’, un cruce entre la variedad local de maíz Azam y un híbrido blanco CHSW, desarrollado por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), México. Dos poblaciones mejoradas de maíz «PSEV3 (S<sub>1</sub>)-C<sub>1</sub> y PSEV3 (S<sub>2</sub>)-C<sub>2</sub>», los cuales fueron desarrollados a partir de la población original (PSEV3) utilizando dos ciclos de selección recurrente de progenie autofecundada (líneas de S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub>) en cinco temporadas de cultivo de primavera y verano durante el 2014 al 2016 en CCRI, Pirsabak - Nowshera, Pakistán (cuadro 1).

### Localidades y procedimiento experimental

Durante la temporada de cultivos de verano del 2017, las poblaciones mejoradas “PSEV3-(S<sub>1</sub>)-C<sub>1</sub> y PSEV3-(S<sub>2</sub>)-C<sub>2</sub>” fueron valoradas en comparación con la población original (PSEV3-C<sub>0</sub>), y tres cultivares de control (Dos OPV: Azam y Jalal y HV: Kiramat) con siembras óptimas (Julio 05, 2017) y tardías (Julio 25, 2017) en dos lugares: a) CCRI, Pirsabak - Nowshera, Pakistán (posicionada entre 32°N y 72°E de latitud y longitud, respectivamente con 288 m de altitud), y b) UAP, Peshawar, Pakistán (Localizada entre 34°N y 71°E de latitud y longitud, respectivamente

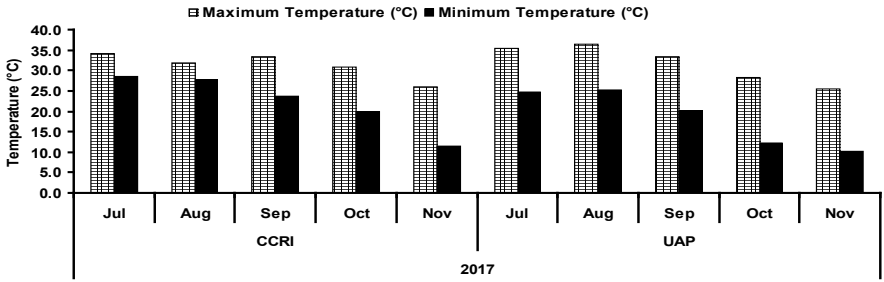


Figure 1. Temperature mean data for summer crop season during 2017 at CCRI and UAP.

Figura 1. Datos de la temperatura media para la temporada de cultivo de verano durante el 2017 en el CCRI y UAP.

**Crop husbandry**

The recommended doses of NPK (200:90:90 kg.ha<sup>-1</sup>) fertilizers were used in the well prepared soil. Nitrogen (N) with half dose, while phosphorus and potash with full doses were utilized in form of urea, single super phosphate and sulphate of potash, respectively during preparation of land and before sowing. The remaining half N was applied to the crop after four weeks of germination. Primextra Gold (720 SC, at the rate of 1.5 L.ha<sup>-1</sup>) was used as pre-emergence for the weeds control. Hand weeding and earthing up operations were also carried out to keep loose the soil and control the leftover weed flora. Confidor-WP-60 (200 SL, at the rate of 50 g.10 kg<sup>-1</sup> maize seed) was used as seed treatment for the control of maize borer (*Chilo partellus*). Furadon 3 % (Carbofuran, at the rate of 20 kg.ha<sup>-1</sup>) granules were used in the whirls of maize plants after 30 days of emergence. Irrigations were carried out with the appropriate period. All the genotypes

con 350 m de altitud). Todos los genotipos de maíz presentaron semillas con forma de sílex blanco que se desarrollaron en el CCRI, Pirsabak - Nowshera, Pakistán. En el CCRI, el suelo era moderadamente calcáreo y arenoso con un pH de 7,7, 0,34 % de materia orgánica, 0,034 % de nitrógeno, 0,0029 % de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0,051 % de K<sub>2</sub>O. Sin embargo, en la UAP el suelo era de naturaleza alcalina y franco arcilloso-limoso con 7,8 de pH, 0,81 % de materia orgánica, 0,063 % de nitrógeno, 7,18 mg.kg<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y 112 ppm de K<sub>2</sub>O. Los datos medios de temperatura durante los meses de los ensayos en ambos sitios experimentales se presentan en la figura 1.

En cada lugar, el diseño de parcelas divididas fue utilizado como diseño experimental con tres repeticiones. Las fechas de siembra fueron tratadas como parcelas principales, mientras que los genotipos de maíz se consideraron como subparcelas en ambos lugares. Cada subparcela

were uniformly considered at both planting dates and sites.

### Data compilation and analysis

Data for all the parameters were documented on single plant basis in each plot and replication for days to silking, cob height, cobs per plant (prolificacy) and cob length. Grain yield at 15 % moisture level of the grains, was approximated as follows.

$$\text{Grain yield (kg.ha}^{-1}\text{)} = \frac{(100 - \text{MC}) \times \text{FEW} \times \text{Shelling Coefficient} \times 10,000}{(100 - 15) \times \text{Plot area}}$$

Whereas; MC = Moisture percentage in the grains, FEW = Fresh ear weight (kg) at the time of harvest, Shelling coefficient = 0.80

All the recorded data regarding evaluation of improved populations - C<sub>1</sub> and C<sub>2</sub>, base population - C<sub>0</sub> and check genotypes across environments were subjected to analysis of variance opportune for genotype x environment interactions (Gomez and Gomez, 1984) using Mstat-C computer program (Bricker, 1991). Means were further dissevered by using LSD<sub>0.05</sub>.

## Results and discussion

Pooled analysis of variance across six maize populations, two sites and planting dates was conducted for flowering and yield traits (table 2). Sites revealed significant variations for cob height, while nonsignificant for all other traits. Planting dates exhibited highly significant variations for time to silking, while significant for cob height and grain yield. Genotypes enunciated highly significant differences for days to silking and cob length, while

constaba de cuatro hileras de cinco metros de longitud y con un espacio entre hileras y plantas de 0,75 y 0,25 m, respectivamente.

### Manejo de los cultivos

Las dosis recomendadas de fertilizantes NPK (200:90:90 kg.ha<sup>-1</sup>) fueron utilizadas en suelos preparados. Una media dosis de Nitrógeno (N), y una dosis completa de fosforo con potasio se utilizaron en forma de urea, superfosfato simple y sulfato de potasio, respectivamente durante la preparación del terreno y antes de la siembra. La mitad restante de N se aplicó al cultivo después de cuatro semanas de germinación. Primextra Gold (720 SC, a razón de 1,5 L.ha<sup>-1</sup>) fue utilizado como pre-emergencia para el control de malezas. También se llevaron a cabo operaciones de deshierbe manual y de puesta a tierra para mantener el suelo suelto y controlar la flora de malezas sobrantes. Se utilizó Confidor-WP-60 (200 SL, a razón de 50 g.10 kg<sup>-1</sup> de semilla de maíz) como tratamiento de semillas para el control del barrenador del maíz (*Chilo partellus*). Se utilizó Furadon 3 % (Carbofuran, a razón de 20 kg.ha<sup>-1</sup>) en gránulos en los remolinos de las plantas de maíz después de 30 días de emergencia. Los riegos se realizaron con el período adecuado. Todos los genotipos se consideraron uniformemente en ambas fechas de siembra y lugares.

### Recopilación y análisis de datos

Los datos para todos los parámetros fueron documentados en base a una sola planta, en cada parcela y por repetición: días hasta el ensilado,

significant for cob height and grain yield. Genotypes revealed greater genetic variability across the sites and planting dates, which can be utilized for identification and improving the maize cyclical populations. Significant variations were recorded among the selected maize S<sub>1</sub> populations for cob length, cobs per plant, grain rows per cob, thousand kernels weight and grain yield (Sohail *et al.*, 2018; Sheikh *et al.*, 2019). Genotype x environment relationships revealed significant variations for flowering and yield variables which authenticated that maize populations could not sustain uniform phenotypic behaviour over diverse environments (Sajjad *et al.*, 2020a, b). Genotype-by-site interactions revealed significant (p<0.05) differences for cob length while non-significant for other traits. However, site by planting date, genotype by planting date, and genotype x site x planting date revealed non-significant differences for all the traits. Past studies revealed that G x E interactions were nonsignificant for earliness traits, plant and cob height, cob traits, and 1000-grain weight in maize (Annor *et al.*, 2019).

### Days to silking

For sites, maize populations consumed least days to silking at UAP (81.81 days) as compared to CCRI (83.14 days) which might be due to high temperature at UAP resulting in stress conditions and early flowering (table 3 and figure 1). In planting times, genotypes with delayed planting exhibited lesser days to silking (76.81 days) than optimum planting (88.14 days). On average, the

altura de la mazorca, mazorcas por planta (prolificidad) y la longitud de la planta. El rendimiento de los granos, con un nivel de humedad del 15%, se aproximó de la siguiente manera:

$$\text{Grain yield (kg.ha}^{-1}\text{)} = \frac{(100\text{-MC}) \times \text{FEW} \times \text{Shelling Coefficient} \times 10.000}{(100\text{-15}) \times \text{Plot area}}$$

Siendo MC = Porcentaje de humedad en los granos, FEW = Peso fresco de la mazorca (kg) en el momento de la cosecha, Coeficiente de desgrane = 0,80

Todos los datos registrados con respecto a la evaluación de poblaciones mejoradas - C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>, población base- genotipos C<sub>0</sub> y de control entre ambientes se sometieron a un análisis de varianza oportuno para las interacciones genotipo x ambiente (Gómez y Gómez, 1984) utilizando el programa informático Mstat-C (Bricker, 1991). Las medias se separaron utilizando LSD<sub>0,05</sub>.

## Resultados y discusión

El análisis de varianza combinado entre seis poblaciones de maíz, dos lugares y fechas de siembra para los rasgos de floración y rendimiento se muestra en el cuadro 2. Los lugares revelaron variaciones significativas para la altura de la mazorca, mientras que no se mostraron significativas para todos los demás rasgos. Las fechas de siembra mostraron variaciones altamente significativas para el tiempo hasta el ensilado, mientras que no fueron significativas para la altura de la mazorca y el rendimiento del grano. Los genotipos determinaron

belated planting took minimum days to silking (75.67 and 77.94 days) than optimum planting (87.94 and 88.33 days) with a decline of 11.33 days (12.85 %). For sites and planting date interactions (L × P), time to silking varied from 75.67 (UAP with delayed planting) to 88.33 days (CCRI with optimum planting). Genotype means over sites and planting dates revealed that improved populations - C<sub>2</sub> (79.00 days) and C<sub>1</sub> (79.42 days) utilized lesser and at par days to silking. However, check genotypes Kiramat and Jalal consumed the highest and same number of days to silking with 86.33 and 84.58 days, respectively.

diferencias altamente significativas para los días hasta el ensilado y la longitud de la planta, mientras que no fueron significativas para la altura de la mazorca y el rendimiento del grano. Los genotipos revelaron una mayor variabilidad genética entre los lugares y las fechas de siembra, las cuales pueden ser utilizadas para identificar y mejorar las poblaciones cíclicas de maíz. Se registraron variaciones significativas entre las poblaciones seleccionadas de maíz S<sub>1</sub> para la longitud de la planta, mazorcas por planta, hileras de grano por mazorca, peso de mil granos y rendimiento de grano (Sohail *et al.*, 2018; Sheikh *et*

**Table 2. Mean squares and significance test for traits evaluated at two sites with different planting dates.**

**Cuadro 2. Cuadrados medios y prueba de significancia para los rasgos evaluados en dos lugares con diferentes fechas de siembra.**

Sources of variation	d.f.	Days to silking	Cob height	Cobs plant <sup>1</sup>	Cob length	Grain yield
Sites (L)	1	32.00 <sup>NS</sup>	2862.72*	0.026 <sup>NS</sup>	0.02 <sup>NS</sup>	15,297.98 <sup>NS</sup>
Error	4	6.61	34.51	0.009	0.51	1,761,132.26
Planting dates (P)	1	2312.00**	1942.72*	0.005 <sup>NS</sup>	4.37 <sup>NS</sup>	63,884,859.23*
L × P	1	16.06 <sup>NS</sup>	522.72 <sup>NS</sup>	0.003 <sup>NS</sup>	1.16 <sup>NS</sup>	1,610,509.67 <sup>NS</sup>
Error	4	7.69	156.60	0.024	1.46	3,014,741.17
Genotypes (G)	5	103.82**	312.22*	0.005 <sup>NS</sup>	10.84**	2,812,111.65*
G × L	5	12.70 <sup>NS</sup>	43.89 <sup>NS</sup>	0.006 <sup>NS</sup>	4.31**	1,019,174.16 <sup>NS</sup>
G × P	5	7.43 <sup>NS</sup>	81.69 <sup>NS</sup>	0.002 <sup>NS</sup>	0.19 <sup>NS</sup>	522,067.62 <sup>NS</sup>
G × L × P	5	6.56 <sup>NS</sup>	116.56 <sup>NS</sup>	0.004 <sup>NS</sup>	0.86 <sup>NS</sup>	754,191.87 <sup>NS</sup>
Error	40	6.65	90.74	0.006	0.56	834,439.78
CV (%)	-	3.13	13.14	7.99	4.24	18.36

\*\* , \*: Significant at p≤0.01 and p≤0.05, respectively, NS: Non-significant.

\*\* , \*: Significativo a p≤0,01 y p≤0,05, respectivamente, NS: No significativo.

In genotype by site by planting date interactions (G × L × P), the mean days to silking varied from 73.33 (C<sub>2</sub> with delayed planting at UAP) to 92.67 days (Kiramat with

*al.*, 2019). La interacción genotipo x ambiente reveló variaciones significativas para las variables de floración y rendimiento, las cuales autenticaron que las poblaciones

optimum planting at CCRI) (table 3). The improved population - C<sub>2</sub> with delayed planting at UAP (73.33 days) and CCRI (73.67 days), check genotype Jalal with delayed planting at UAP (73.67 days), population - C<sub>1</sub> with delayed planting at CCRI (74.67 days) and UAP (75.33 days) revealed the lesser and same number of days to silking. Check varieties Kiramat and Jalal with optimum planting at both sites owned maximum and same days to silking ranged between 90.00 to 92.67 days, respectively. Overall, the improved populations - C<sub>2</sub> and C<sub>1</sub> showed early silking as compared to check genotypes across the environments. Genotypes with delayed planting utilized less days to silking at UAP than CCRI across the environments which might be due to abiotic stress conditions i.e., temperature and initiation of reproductive phase.

Present findings authenticated that newly developed superior populations were relatively more steady and sustainable. Based upon the pessimistic responses, a desirable decline in days flowering was recorded in maize selected S<sub>1</sub> populations (Guimaraes *et al.*, 2018; Sajjad *et al.*, 2020a, d). Due to repeated self-pollination and intensive selection, the affirmative genes could have been assembled, which made stable the maize C<sub>1</sub> and C<sub>2</sub> populations and enunciated steadiness in early maturity (Sajjad *et al.*, 2020b, c).

### Cob height

Overall, the maize genotypes exhibited lower mean values for cob height at CCRI (66.17 cm) than UAP (table 3). For

de maíz no podían mantener un comportamiento fenotípico uniforme en diversos entornos (Sajjad *et al.*, 2020a, b). La interacción genotipo x lugar revelaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para la longitud de mazorca, mientras que no fueron significativas para los otros rasgos. Sin embargo, las interacciones lugar x fecha de siembra, genotipo x fecha de siembra y genotipo x sitio x fecha de siembra revelaron diferencias no significativas para todos los rasgos. Estudios anteriores revelaron que la interacción G x E no fue significativa para los rasgos de precocidad, la altura de la planta y de la mazorca, los rasgos de la mazorca y el peso de 1000 granos en el maíz (Annor *et al.*, 2019).

### Días para el ensilado

En cuanto a los lugares, las poblaciones de maíz consumieron menos días hasta el ensilado en UAP (81,81 días) en comparación al CCRI (83,14 días), podría deberse a las elevadas temperaturas de la UAP, que dieron lugar a condiciones de estrés y a una floración temprana (cuadro 3 y Figura 1). En cuanto a los tiempos de siembra, los genotipos con siembra tardía mostraron menos días al ensilado (76,81 días) que la siembra óptima (88,14 días). En promedio, la siembra tardía toma menos días al ensilado (75,67 y 77,94 días) que la siembra óptima (87,94 y 88,33 días) con un descenso de 11,33 días (12.85 %). Para las interacciones de lugares por fechas de siembra (L x P), el tiempo a ensilado varió de 75,67 (UAP con siembra tardía) a 88,33 días (CCRI con siembra óptima). Las medias de los genotipos en función de los lugares



planting dates, the least cob height was recorded with delayed planting (67.28 cm) by comparing to optimum planting (77.67 cm), with a decrease of 10.39 cm (13.38%). For site  $\times$  planting date, delayed sown populations exhibited least cob height (58.28 cm) while other relationships of sites and planting dates observed with the highest cob height varied from 74.06 to 81.28 cm. Populations means over sites and planting dates were between 67.50 ( $C_0$ ) to 81.67 cm (Jalal) for cob height. Five genotypes ( $C_0$ ,  $C_1$ ,  $C_2$ , Azam, and Kiramat) exhibited least and same cob height varied between 67.50 to 72.67 cm while check cultivar Jalal attained the highest cob height (81.67 cm).

In genotype  $\times$  site  $\times$  planting date interactions, the mean vales varied from 52.33 (Azam at CCRI with delayed planting) to 93.33 cm (Jalal at CCRI with optimum planting) (table 3). However, the least and alike cob height was obtained in check cultivars i.e., Azam (52.33), and Kiramat (60.00 cm), and improved populations  $C_2$  (57.33 cm) and  $C_1$  (61.67 cm) when were planted late at CCRI. In the case of morphological traits such as cob height, the cyclical populations ( $C_0$ ,  $C_1$ , and  $C_2$ ) presented least and identical values, while check variety Jalal presumed the highest cob height.

Significant decline and enhancement were recorded for plant stature, cob height, and yield traits, respectively with the selection in maize  $S_1$  progenies (Kolawole *et al.*, 2017). Similarly, considerable genetic variation for plant stature and cob height have also been reported among maize populations (Ayiga-Aluba *et al.*, 2015; Khamkoh *et al.*, 2019).

y las fechas de siembras revelaron que las poblaciones mejoradas -C2 (79,00 días) y C1 (79,42 días) utilizaron menos e iguales días hasta el ensilado. Sin embargo, los genotipos de control Kiramat y Jalal consumieron el mayor y mismo número de días hasta el ensilado con 86,33 y 84,58 días, respectivamente.

Las interacciones de genotipo por lugar por día de siembra ( $G \times L \times P$ ), en los días medios hasta el ensilado, variaron de 73,33 ( $C_2$  con siembra tardía en el UAP) a 92,67 días (Kiramat con una siembra óptima en el CCRI) (cuadro 3). La población mejorada -  $C_2$  con siembra tardía en UAP (73,33 días) y CCRI (73,67 días), el genotipo control Jalal con siembra tardía en UAP (73,67 días), población -  $C_1$  con siembra tardía en CCRI (74,67 días) y en UAP (75,33 días) revelaron los menores y similares números de días hasta el ensilado. Las variedades control Kiramat y Jalal con una siembra óptima en ambos lugares poseían el máximo y el mismo rango de días hasta el ensilado, entre 90,00 a 92,67 días, respectivamente. En general, las poblaciones mejoradas -  $C_2$  y  $C_1$  mostraron un ensilado temprano en comparación a los genotipos control en los entornos. Los genotipos con siembra tardía utilizaron menos días hasta el ensilado en UAP que CCRI entre los ambientes, lo cual puede producirse debido a las condiciones de estrés abiótico, tales como temperatura e iniciación de la fase reproductiva.

Los presentes hallazgos demostraron que las poblaciones superiores desarrolladas, fueron relativamente más constantes y



**Table 3. Mean performance of maize populations and check genotypes over sites and planting dates for days to silking and cob height.**

**Cuadro 3. Rendimiento medio de las poblaciones de maíz y de los genotipos de control sobre los lugares y las fechas de siembra para los días hasta el ensilado y la altura de la mazorca.**

Genotypes	CCRI		UAP		Means (days)
	Early planting	Late planting	Early planting	Late planting	
<b>Cyclical populations</b>	<b>Days to silking (days)</b>				
PSEV3-C <sub>0</sub>	89.33	78.00	90.33	77.67	83.83
PSEV3-(S <sub>1</sub> )-C <sub>1</sub>	84.00	74.67	83.67	75.33	79.42
PSEV3-(S <sub>2</sub> )-C <sub>3</sub>	84.00	73.67	85.00	73.33	79.00
Check genotypes (G)					
Azam	88.00	77.00	86.00	75.67	81.67
Jalal	92.00	82.00	90.67	73.67	84.58
Kirammat	92.67	82.33	92.00	78.33	86.33
Means (days)	88.33	77.94	87.94	75.67	-
Means (sites - L)	83.14	-	81.81	-	-
Means (planting times - P)	88.14	-	-	76.81	-
LSD <sub>0.05</sub> Genotypes: 2.13, Sites: 1.68, Planting times: 1.82, G × P: NS, G × L: NS, L × P: NS, G × P × L: NS					
<b>Cyclical populations</b>	<b>Cob height (cm)</b>				<b>Means (cm)</b>
PSEV3-C <sub>0</sub>	66.67	54.33	81.33	67.67	67.50
PSEV3-(S <sub>1</sub> )-C <sub>1</sub>	63.33	61.67	73.33	73.33	67.92
PSEV3-(S <sub>2</sub> )-C <sub>2</sub>	71.00	57.33	85.00	77.33	72.67
Check genotypes (G)					
Azam	77.67	52.33	79.00	80.67	72.42
Jalal	93.33	64.00	86.33	83.00	81.67
Kirammat	72.33	60.00	82.67	75.67	72.67
Means (cm)	74.06	58.28	81.28	76.28	-
Means (sites - L)	66.17	-	78.78	-	-
Means (planting times - P)	77.67	-	-	67.28	-
LSD <sub>0.05</sub> Genotypes: 7.86, Sites: 8.19, Planting times: 3.85, G × P: NS, G × L: NS, L × P: NS, G × P × L: NS					
<b>Cyclical populations</b>	<b>Cobs plant<sup>-1</sup> (#)</b>				<b>Means (#)</b>
PSEV3-C <sub>0</sub>	0.98	0.87	0.95	0.96	0.94
PSEV3-(S <sub>1</sub> )-C <sub>1</sub>	0.99	1.03	0.99	0.93	0.99
PSEV3-(S <sub>2</sub> )-C <sub>2</sub>	0.94	0.90	0.99	1.00	0.96
Check genotypes (G)					
Azam	0.93	0.90	0.94	0.97	0.93
Jalal	0.92	0.88	0.97	0.95	0.93
Kirammat	0.90	0.91	0.96	0.99	0.94
Means (#)	0.94	0.91	0.97	0.97	-
Means (sites - L)	0.93	-	0.97	-	-
Means (planting times - P)	0.96	-	-	0.94	-
LSD <sub>0.05</sub> Genotypes: NS, Sites: NS, Planting times: NS, G × P: NS, G × L: NS, L × P: NS, G × P × L: NS					

### Cobs per plant

On average, the maximum prolificacy was recorded at UAP (0.97), pursued by CCRI (0.93) (table 3). For planting dates, the maximum cobs per plant were obtained by the genotypes with optimum planting (0.96), followed by delayed planting (0.94) with a decline of 0.02 (2.08 %). The site by planting date means varied between 0.91 (CCRI with delayed planting) to 0.97 (UAP with optimum and delayed planting). Genotype means over sites enunciated that improved populations -  $C_1$  (0.99) and  $C_2$  (0.96) revealed maximum number of cobs per plant, followed by original population -  $C_0$  (0.94) while least and same cobs per plant (0.93) were observed in check genotypes Azam and Jalal (table 4).

In  $G \times L \times P$  interactions, improved populations -  $C_1$  and  $C_2$  with delayed planting revealed maximum cobs per plant at CCRI (1.03) and UAP (1.00), respectively. However, the minimum number of cobs per plant were observed in original population -  $C_0$  (0.87) and check cultivar Jalal (0.88) with delayed planting at CCRI.

### Cob length

For sites, the cob length values over genotypes were 17.57 cm and 17.72 cm at CCRI and UAP, respectively (table 4). In planting dates, the cob length in the genotypes ranged between 17.43 (delayed planting) to 17.86 cm (optimum planting), respectively with a decline of 0.43 cm (2.47 %). For site by planting date, the genotype means varied between 17.24 (CCRI with delayed planting) to 17.90 cm (CCRI with optimum planting).

sostenibles. En comparación con algunos resultados no satisfactorios, se registró una disminución deseable de los días a floración en las poblaciones S1 de maíz seleccionadas (Guimaraes *et al.*, 2018; Sajjad *et al.*, 2020a, d). Debido a la autopolinización repetida y a la selección intensiva, los genes deseables pudieron haber sido fijados, los cuales hicieron estables las poblaciones de maíz  $C_1$  y  $C_2$  y determinaron la estabilidad en la madurez temprana (Sajjad *et al.*, 2020b, c).

### Altura de la mazorca

En general, los genotipos del maíz mostraron valores medios menores para la altura de la mazorca en CCRI (66,17 cm) que en UAP (cuadro 3). Para las fechas de siembra, la menor altura fue registrada para la siembra tardía (67,28 cm) en comparación con la siembra óptima (77,67 cm), con un descenso de 10,39 cm (13,38%). Para lugar por fecha de siembra, las poblaciones de siembra tardía mostraron una menor altura (58,28 cm), mientras en otras interacciones de lugares por fechas de siembra se observó que la altura más alta de mazorca varió de 74,06 a 81,28 cm. Las medias de las poblaciones sobre los lugares y las fechas de siembra fueron entre 67,50 ( $C_0$ ) a 81,67 cm (Jalal) para la altura de mazorca. Cinco genotipos ( $C_0$ ,  $C_1$ ,  $C_2$ , Azam, y Kiramat) mostraron la menor y misma altura, que varió entre 67,50 a 72,67 cm, mientras que el cultivo control Jalal alcanzó la mayor altura (81,67 cm).

En las interacciones de genotipo x lugar x fecha de siembra, los valores

**Table 4. Mean performance of maize populations and check genotypes over sites and planting dates for cob length and grain yield.**

**Cuadro 4. Rendimiento medio de las poblaciones de maíz y de los genotipos control sobre los lugares y las fechas de siembra para la longitud de la mazorca y el rendimiento de grano.**

Genotypes	CCRI		UAP		Means (cm)
	Early planting	Late planting	Early planting	Late planting	
<b>Cyclical populations</b>	<b>Cob length (cm)</b>				<b>Means (cm)</b>
PSEV3-C <sub>0</sub>	15.63	14.79	16.67	16.8	15.97
PSEV3-(S <sub>1</sub> )-C <sub>1</sub>	17.38	16.91	17.95	17.46	17.43
PSEV3-(S <sub>2</sub> )-C <sub>2</sub>	18.9	18.38	17.78	18.17	18.31
Check genotypes (G)					
Azam	17.56	16.05	17.78	18.04	17.36
Jalal	18.8	18.5	18.56	18.07	18.48
Kiramat	19.13	18.8	18.15	17.15	18.31
Means (cm)	17.90	17.24	17.82	17.62	
Means (sites - L)	17.57	-	17.72	-	
Means (planting times - P)	17.86	-	-	17.43	
LSD <sub>0.05</sub> Genotypes: 0.62, Sites: NS, Planting times: NS, G × P: NS, G × L: 0.59, L × P: NS, G × P × L = NS					
<b>Cyclical populations</b>	<b>Grains yield (kg ha<sup>-1</sup>)</b>				<b>Means (kg ha<sup>-1</sup>)</b>
PSEV3-C <sub>0</sub>	4846	3137	5344	3866	4298
PSEV3-(S <sub>1</sub> )-C <sub>1</sub>	5780	3947	6042	3408	4794
PSEV3-(S <sub>2</sub> )-C <sub>2</sub>	6524	4082	5354	4585	5136
Check genotypes (G)					
Azam	5199	3460	5825	4574	4765
Jalal	7793	4326	6240	4623	5746
Kiramat	6165	4258	5883	4122	5107
Means (kg ha <sup>-1</sup> )	6051	3868	5781	4196	-
Means (sites - L)	4960	-	4989	-	-
Means (planting times - P)	5916	-	-	4032	-

LSD<sub>0.05</sub> Genotypes: 750.0, Sites: NS, Planting times: 1114.0, G × P: NS, G × L: NS, L × P: NS, G × P × L: NS

Genotype means over sites and planting dates revealed that the highest and at par cob length was obtained in maize improved population - C<sub>2</sub> (18.31 cm), and check varieties Jalal (18.48 cm) and Kiramat (18.31 cm) (table 4). Nevertheless, the least cob length was recorded in base population - C<sub>0</sub> (15.97 cm). In genotype

medios variaron de 52,33 (Azam en CCRI con siembra tardía) a 93,33 cm (Jalal en CCRI con siembra óptima) (cuadro 3). Sin embargo, la altura de mazorca más baja y parecida se obtuvo en los cultivares de control, es decir, Azam (52,33) y Kiramat (60,00 cm), y en las poblaciones mejoradas C<sub>2</sub> (57,33 cm) y C<sub>1</sub> (61,67 cm) cuando

by site by planting date interactions, the highest cob length was exhibited by improved population - C<sub>2</sub> (18.90 cm), check genotypes Kiramat (19.13 cm) and Jalal (18.80 cm) with optimum planting at CCRI. However, original population - C<sub>0</sub> with delayed (14.79 cm) and optimum planting (15.63) at CCRI recorded with least cob length.

### Grain yield

For sites, overall the utmost grain yield was obtained in maize populations grown at UAP (4989 kg.ha<sup>-1</sup>), pursued by CCRI (4960 kg.ha<sup>-1</sup>) because of the genotypes extra least grain yield at CCRI with delayed planting (3868 kg.ha<sup>-1</sup>) which affected the average yield (table 4). However, by comparing the average grain yield of the genotypes with optimum planting at both sites, the CCRI (6051 kg.ha<sup>-1</sup>) was leading than UAP (5781 kg.ha<sup>-1</sup>) which might be due to longer growth period caused by low temperature and delayed flowering at CCRI (figure 1). Overall, the populations with optimum planting exposed the enhanced grain yield (5916 kg.ha<sup>-1</sup>), pursued by delayed planting (4032 kg.ha<sup>-1</sup>) with decline of 31.85% (1884 kg.ha<sup>-1</sup>). Site by planting date relationship displayed that genotypes with optimum planting produced superior grain yield at CCRI (6051 kg.ha<sup>-1</sup>), which was found at par with UAP (5781 kg.ha<sup>-1</sup>). Nonetheless, the genotypes with delayed planting at CCRI exhibited least grain yield (3868 kg.ha<sup>-1</sup>).

Maize populations across environments enunciated that the highest and same grain yield was presented by superior population -

se sembraron tarde en el CCRI. En el caso de las poblaciones cíclicas (C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, y C<sub>2</sub>) presentaron menos e idénticos valores, mientras que la variedad de control Jalal presentó la mayor altura de mazorca.

Se registró una disminución y un aumento significativo de la estatura de las plantas y los rasgos de rendimiento, respectivamente con la selección en las progenies de maíz S1 (Kolawole *et al.*, 2017). Del mismo modo, también se ha informado de una considerable variación genética para la estatura de la planta y la altura de la mazorca entre las poblaciones de maíz (Ayiga-Aluba *et al.*, 2015; Khamkoh *et al.*, 2019).

### Mazorcas por planta

En promedio, la mayor prolificidad se registró en UAP (0,97), seguido de CCRI (0,93) (cuadro 3). En cuanto a las fechas de siembra, los máximos de mazorcas por planta se obtuvieron en los genotipos con siembra óptima (0,96), seguidos de las de siembra tardía (0,94) con una disminución de 0,02 (2,08 %). Las medias de los lugares por fecha de siembra variaron de 0,91 (CCRI con siembra tardía) a 0,97 (UAP con siembra óptima y tardía). Las medias de los genotipos por lugares determinaron que las poblaciones mejoradas - C1 (0,99) y C2 (0,96) revelaron el máximo número de mazorcas por planta, seguidas por la población original - C<sub>0</sub> (0,94), mientras que la menor e igual cantidad de mazorcas por planta (0,93) se observó en los genotipos de control Azam y Jalal (cuadro 4).

En las interacciones G × L × P, las poblaciones mejoradas - C<sub>1</sub> y

$C_2$  (5136 kg.ha<sup>-1</sup>) and check varieties Jalal (5746 kg.ha<sup>-1</sup>) and Kiramat (5107 kg.ha<sup>-1</sup>) (table 4). Though, the original population -  $C_0$  exhibited least grain yield (4298 kg.ha<sup>-1</sup>). The interactions due to genotype  $\times$  site  $\times$  planting date exposed that the maximum and alike grain yield was obtained in check variety Jalal (7793 kg.ha<sup>-1</sup>) and advanced population -  $C_2$  (6524 kg.ha<sup>-1</sup>) with optimum planting at CCRI. Nevertheless, the decreased grain yield was recorded in original population -  $C_0$  at CCRI with delayed planting (3137 kg.ha<sup>-1</sup>).

Results further revealed that above promising improved population -  $C_2$  and  $C_1$  were best performing for cobs.plant<sup>-1</sup>, cob length and grain yield with optimum planting at CCRI. However, original population -  $C_0$  showed least mean values and unproductive recital for yield related parameters with optimum and delayed plantings at both sites. Past studies also authenticated that improved populations revealed best performance and the highest grain yield than base population, which confirmed that might the feasible genes accumulated in the particular versions of the maize populations (Khamkoh *et al.*, 2019; Kolawole *et al.*, 2019). Significant impact of the recurrent selection cycles was observed on cob traits and grain yield, and the improved populations  $C_1$  and  $C_2$  executed better performance than maize base population (Ayiga-Aluba *et al.*, 2015; Sohail *et al.*, 2018; Sajjad *et al.*, 2020a, b). For quantitative traits, the recurrent selection efficiently enhanced the occurrence of enviable

$C_2$  con siembra tardía revelaron la máxima cantidad de mazorcas por planta en CCRI (1,03) y en UAP (1,00), respectivamente. Sin embargo, el mínimo número de mazorcas por plantas se observó en poblaciones originales -  $C_0$  (0,87) y en el cultivo de control Jalal (0,88) con siembra tardía en CCRI.

### Longitud de la mazorca

Para los lugares, los valores de longitud de la mazorca fueron 17,57 cm y 17,72 cm en CCRI y en UAP, respectivamente (cuadro 4). En las fechas de siembra, la longitud de la mazorca en los genotipos osciló entre 17,43 (siembra tardía) a 17,86 cm (plantación óptima), respectivamente con un descenso de 0,43 cm (2,47 %). Para el lugar por fecha de siembra, las medias del genotipo variaron entre 17,24 (CCRI con siembra tardía) a 17,90 cm (CCRI con siembra óptima).

Las medias de los genotipos en función de los lugares y las fechas de siembra revelaron la longitud de mazorca más alta, y se obtuvo en la población mejorada de maíz -  $C_2$  (18,31 cm), y en las variedades de control Jalal (18,48 cm) y Kiramat (18,31 cm) (cuadro 4). Sin embargo, la menor longitud de mazorca se registró en la población base -  $C_0$  (15,97 cm). En las interacciones genotipo por lugar y fecha de siembra, la mayor longitud de mazorca se presentó para la población mejorada -  $C_2$  (18,90 cm), los genotipos de control Kiramat (19,13 cm) y Jalal (18,80 cm) con plantación óptima en CCRI. Sin embargo, la población original -  $C_0$  con retraso (14,79 cm) y siembra óptima (15,63) en CCRI registró la menor longitud de mazorca.

genes in a maize population and the adverse genes were eventually bared to the early selection (Andorf *et al.*, 2019; Sajjad *et al.*, 2020c, d).

Recurrent selection being an imperative breeding approach, reinstatement of genetic inconsistency, and consequent development within the maize populations can be made through early generations (Sajjad *et al.*, 2016; Sampoux *et al.*, 2020). Though late maturing maize populations are high yielding due to the accretion of relatively greater magnitude of photosynthates; however, early maturity is evenly pleasing to avoid the maize crop from biotic and abiotic apprehensions mostly practised at later growth stages.

## Conclusions

Maize newly developed improved populations PSEV3-(S<sub>1</sub>)-C<sub>1</sub> and PSEV3-(S<sub>2</sub>)-C<sub>2</sub> revealed earliness and least mean values for days to silking and cob height. However, these superior populations showed increased mean values for prolificacy, cob length and eventually increased grain yield compared to original population and check genotypes across the environments. Promising populations might accumulated favourable genes resulting in stability for earliness and increased grain yield. Therefore, for improving maize populations, the selfed progeny recurrent selection was found as more efficient.

*End of English version*

---

## Rendimiento de grano

Para los lugares, en general, el mayor rendimiento de grano se obtuvo en las poblaciones de maíz sembradas en UAP (4.989 kg.ha<sup>-1</sup>), seguidas por CCRI (4.960 kg.ha<sup>-1</sup>) debido a que los genotipos extra mostraron menos rendimiento de grano en el CCRI con la siembra tardía (3.868 kg.ha<sup>-1</sup>) lo cual afectó el rendimiento promedio (cuadro 4). Sin embargo, comparando el rendimiento promedio de grano de los genotipos con la siembra óptima en ambos lugares, el CCRI (6.051 kg.ha<sup>-1</sup>) lideró sobre UAP (5.781 kg.ha<sup>-1</sup>), lo cual puede deberse a un periodo de crecimiento más largo causado por la baja temperatura y la floración tardía en CCRI (Figura 1). En general, las poblaciones con siembra óptima expusieron el mayor rendimiento de grano (5.916 kg.ha<sup>-1</sup>), seguidas por la siembra tardía (4.032 kg.ha<sup>-1</sup>) con un descenso del 31,85% (1.884 kg.ha<sup>-1</sup>). La relación lugar por fecha de siembra mostró que los genotipos con plantación óptima produjeron un rendimiento de grano superior en CCRI (6.051 kg.ha<sup>-1</sup>), lo cual se ubicó a la par con UAP (5.781 kg.ha<sup>-1</sup>). Sin embargo, los genotipos con plantación tardía en CCRI mostraron el menor rendimiento de grano (3.868 kg.ha<sup>-1</sup>).

Las poblaciones de maíz en distintos entornos demostraron que el más alto y mismo rendimiento de grano fue obtenido por una población superior - C<sub>2</sub> (5.136 kg.ha<sup>-1</sup>) y las variedades de control Jalal (5.746 kg.ha<sup>-1</sup>) y Kiramat (5.107 kg.ha<sup>-1</sup>) (cuadro 4). Aunque la población original - C<sub>0</sub> arrojó el menor rendimiento de grano (4.298 kg.ha<sup>-1</sup>), las interacciones de genotipo × lugar ×

día de siembra demostraron el máximo y mismo rendimiento de grano que se obtuvo con la variedad Jalal (7.793 kg.ha<sup>-1</sup>) y la población avanzada - C<sub>2</sub> (6.524 kg.ha<sup>-1</sup>) con siembra óptima en CCRI. Sin embargo, la disminución del rendimiento de grano se registró en la población original - C<sub>0</sub> en CCRI con población tardía (3.137 kg.ha<sup>-1</sup>).

Los resultados revelaron que las poblaciones mejoradas C<sub>2</sub> y C<sub>1</sub> fueron las más productivas en cuanto a mazorcas.planta<sup>-1</sup>, longitud de mazorca y rendimiento de grano con la plantación óptima en CCRI. Sin embargo, la población original - C<sub>0</sub> mostró los valores medios más bajos y un comportamiento improductivo para los parámetros de rendimiento relacionados con las siembras óptimas y tardías en ambos lugares. Estudios anteriores también demostraron que las poblaciones mejoradas revelaron el mejor rendimiento y la mayor producción de grano que la población base, lo que confirmó que los genes deseables pueden ser acumulados en versiones particulares de poblaciones de maíz (Khamkoh *et al.*, 2019; Kolawole *et al.*, 2019). Se observó un impacto significativo de los ciclos de selección recurrente en los rasgos de la mazorca y de rendimiento de grano, y las poblaciones mejoradas C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> demostraron un mejor rendimiento que la población base de maíz (Ayiga-Aluba *et al.*, 2015; Sohail *et al.*, 2018; Sajjad *et al.*, 2020a, b). En el caso de los rasgos cuantitativos, la selección recurrente mejoró eficientemente la aparición de genes deseables en una población de maíz y los genes adversos fueron finalmente despojados de la

selección temprana (Andorf *et al.*, 2019; Sajjad *et al.*, 2020c, d).

La selección recurrente es un enfoque de mejoramiento imperativo; el restablecimiento de la inconsistencia genética y el consiguiente desarrollo dentro de las poblaciones de maíz se puede hacer a través de las primeras generaciones (Sajjad *et al.*, 2016; Sampoux *et al.*, 2020). Aunque las poblaciones de maíz de maduración tardía son de alto rendimiento debido a la acumulación de una magnitud relativamente mayor de fotosintatos, la madurez temprana es deseable para evitar que el cultivo de maíz se exponga a amenazas bióticas y abióticas que aparecen en etapas de crecimiento posteriores.

## Conclusiones

Las recientes poblaciones mejoradas de maíz PSEV3-(S<sub>1</sub>)-C<sub>1</sub> y PSEV3-(S<sub>2</sub>)-C<sub>2</sub> revelaron valores promedios tardíos y menores para los días hasta el ensilado y para la altura de mazorca. Sin embargo, estas poblaciones superiores mostraron un aumento de los valores promedio para prolificidad, la longitud de las mazorcas y finalmente un mayor rendimiento de grano en comparación con la población original y los genotipos de control en todos los entornos. Las poblaciones promotoras pueden acumular genes favorables que dan lugar a la estabilidad de la precocidad y al aumento del rendimiento de grano. Por lo tanto, para mejorar las poblaciones de maíz, la selección recurrente de la progenie autofecundada resultó ser más eficiente.



## Cited literature

- Ali, S., N.U. Khan, I.H. Khalil, M. Iqbal, S. Gul, S. Ahmed, N. Ali, M. Sajjad, K. Afridi, I. Ali and S.M. Khan. 2017. Environment effects for earliness and grain yield traits in  $F_1$  diallel populations of maize (*Zea mays* L.). J. Sci. Food Agric. 97: 4408-4418.
- Ali, S., N.U. Khan, S. Gul, R. Goher, I. Naz, S.A. Khan, N. Ali, M. Saeed, I. Hussain, S.M. Khan and I. Ali. 2019. Heterotic effects for yield related attributes in  $F_1$  populations of maize. Pak. J. Bot. 51: 1675-1686.
- Ali, S., N.U. Khan, S. Gul, S.U. Khan, I. Tahir, Z. Bibi, I.H. Khalil, N. Ali, S.A. Khan, I. Hussain, I. Ali and S.M. Khan. 2020. Genotype by environment interactions affecting heterotic effects in maize for earliness traits and grain yield. Int. J. Agric. Biol. 23(5): 983-993.
- Ali, S., N.U. Khan, R. Gul, I. Naz, R. Goher, N. Ali, S.A. Khan, I. Hussain, M. Saeed and M. Saeed. 2018. Genetic analysis for earliness and yield traits in maize. Pak. J. Bot. 50: 1395-1405.
- Andorf, C., W.D. Beavis, M. Huford, S. Smith, W.P. Suza, K. Wang, M. Woodhouse, J. Yu and T. Lübberstedt. 2019. Technological advances in maize breeding: past, present and future. Theor. Appl. Genet. 132(3): 817-849.
- Annor, B., B. Badu-Apraku, D. Nyadanu, R. Akromah and M.A.B. Fakorede. 2019. Testcross performance and combining ability of early maturing maize inbreds under multiple-stress environments. Sci. Rep. 9: 13809
- Ayiga-Aluba, J., R. Edema, G. Tusiime, G. Asea and P. Gibson. 2015. Response to two cycles of  $S_1$  recurrent selection for turicum leaf blight in an open pollinated maize variety population (Longe 5). Adv. Appl. Sci. Res. 6(12): 4-12.
- Bricker, B. 1991. Mstat-C: A microcomputer programme for design management and analysis of agronomic research experiments. Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA.
- Chen, Z.H., Y.F. Zhu, A.G. Wang, X.Y. Guo, X. Wu and P.F. Liu. 2019. Effects of reciprocal recurrent selection on grain yield in two tropical-temperate maize synthetic populations Tuxpeño-Reid and Suwan-Lancaster. Am. J. Plant Sci. 10: 298-308.
- Gomez, K.A. and A.A. Gomez. 1984. Statistical Procedures for Agricultural Research. John Wiley and Sons, New York, U. S. A.
- Guimaraes, A.G., A.T.A. Junior, J.E.A. Filho, G.F. Pena, C. Vittorazzi and M.G. Pereira. 2018. Population structure and impact of recurrent selection on popcorn using EST-SSR markers. Acta Scient. Agron. 40: e35218: 1-10.
- Khamkoh, W., D. Ketthaisong, K. Lomthaisong, K. Lertrat and B. Suriharn. 2019. Recurrent selection method for improvement of lutein and zeaxanthin in orange waxy corn populations. Aust. J. Crop Sci. 13(04): 566-573.
- Khan, K., N.U. Khan, M. Iqbal, H. Sher, S. Gul and N. Ali. 2018. Populations of exotic  $\times$  locally adapted germplasm - A potential source of inbred lines for superior indigenous maize hybrids. Tarim. Bilim. Derg. - J. Agric. Sci. 24: 413-421.
- Kolawole, A.O., A. Menkir, E. Blay, K. Ofori and J.G. Kling. 2019. Changes in heterosis of maize (*Zea mays* L.) varietal cross hybrids after four cycles of reciprocal recurrent selection. Cereal Res. Commun. 47(1): 145-156.
- Kolawole, A.O., A. Menkir, M. Gedil, E. Blay, K. Ofori and J.G. Kling. 2017. Genetic divergence in two tropical maize composites after four cycles of reciprocal recurrent selection. Plant Breed. 136(1): 41-49.
- Martin, J.H., R.P. Waldren and D.L. Stamp. 2006. Principles of field crop production. 4<sup>th</sup> edition. Pearson Education, Inc. New Jersey, USA.
- Pakistan Economic Survey. 2018-19. Ministry of Finance, Revenue and Economic Affairs, Islamabad, Pakistan. Available in: [http://www.finance.gov.pk/survey\\_1819.html](http://www.finance.gov.pk/survey_1819.html).








- Sajjad, M., N.U. Khan, H. Rahman, K. Khan and G. Hassan. 2016. Response of a maize composite to selfed progeny recurrent selection for earliness and yield traits. *Maydica* 61(3): 1-8.
- Sajjad, M., N.U. Khan, S. Gul, S.U. Khan, I.H. Khalil, S.A. Khan, S. Ali, N. Ali, I. Tahir, Z. Bibi, S.M. Khan and I. Hussain. 2020a. Maize cyclical populations (PSEV3-C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub> and C<sub>2</sub>) response over diverse environments. *Int. J. Agric. Biol.* 24: 16551664.
- Sajjad, M., N.U. Khan, S. Gul, S.U. Khan, I. Tahir, Z. Bibi, S. Ali, N. Ali, S.A. Khan, S.M. Khan and I. Hussain. 2020b. Maize (*Zea mays* L.) cyclical populations response over environments - developed via recurrent selection. *Maydica* 65(1): 1-10.
- Sajjad, M., N.U. Khan, S. Gul, S.U. Khan, S. Ali, S.A. Khan, N. Ali, I. Tahir, Z. Bibi, I. Hussain and S.M. Khan. 2020c. Assessment of maize S<sub>1</sub> and S<sub>2</sub> lines for earliness and yield traits developed from base population - PSEV3-S<sub>0</sub> using recurrent selection. *Int. J. Agric. Biol.* 24: 1806-1814.
- Sajjad, M., N.U. Khan, S. Gul, S.U. Khan, Z. Bibi, S. Ali, N. Ali and S.A. Khan. 2020d. Maize improvement through selfed progeny recurrent selection across different environments. *Pak. J. Bot.* 52(2): 541-549.
- Sampoux, J.P., H. Giraud and I. Litrico. 2020. Which recurrent selection scheme to improve mixtures of crop species? Theoretical expectations. *G3: Genes, Genomes, Genet.* 10(1): 89-107.
- Sheikh, F., A. Sohail, T. Burni, F. Hadi, M. Asad, A. Aziz, A. Haleem, M. Maryam and Z. Rahman. 2019. Impact of half-sib family recurrent selection on grain yield in maize population ZM-309. *Pure Appl. Biol.* 8(3): 2399-2408.
- Sohail, A., Q. Hussain, S. Ali, Manzoor, F. Hadi, S. Uddin, F. Bashir, M. Asad, S. Sami and Z. Yousafzai. 2018. Evidence of improving yield and yield attributes via half-sib family recurrent selection in maize (*Zea mays* L.). *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol.* 5(12): 45-56.
- Udo, E.F., S.O. Ajala and A.B. Olaniyan. 2017. Physiological and morphological changes associated with recurrent selection for low nitrogen tolerance in maize. *Euphytica* 213: 140.

## Physiological and root morphological responses in different combinations of rootstock-scion of cacao to water deficit

Respuestas fisiológicas y morfológicas de raíces en diferentes combinaciones de patrones e injertos de cacao al déficit hídrico

Respostas fisiológicas e morfológicas de raízes em combinações de padrões e clones de cacau ao déficit hídrico

Ramón Jaimez<sup>1,5\*</sup>, Gregorio Vásconez<sup>2</sup>, Ignacio Sotomayor<sup>3</sup>, Grisnel Quijano<sup>3</sup>, Jaime Morante<sup>4</sup>, Francisco Arteaga<sup>1</sup> and George Cedeño-García<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Técnica Manabí. Facultad de Ingeniería Agronómica. Ecuador. Correo electrónico: (RJ) [rjaimezarellano@gmail.com](mailto:rjaimezarellano@gmail.com), ; (FA) [javier.artea@utm.edu.ec](mailto:javier.artea@utm.edu.ec), ; (GV) [George.cedeno@utm.edu.ec](mailto:George.cedeno@utm.edu.ec), . <sup>2</sup>Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Ecuador. Correo electrónico: [gregorio\\_vasconez@yahoo.es](mailto:gregorio_vasconez@yahoo.es), . <sup>3</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Estación Experimental Tropical Pichilingue Ecuador. Correo electrónico: (IS) [ignacio.sotomayorc@iniap.gob.ec](mailto:ignacio.sotomayorc@iniap.gob.ec), ; (GQ) [grisnel.quijano@yahoo.com](mailto:grisnel.quijano@yahoo.com), . <sup>4</sup>Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Ecuador. Grupo de Biotecnología Genómica. Correo electrónico: [jmorante@uteq.edu.ec](mailto:jmorante@uteq.edu.ec) . <sup>5</sup>Universidad de Los Andes. Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Mérida, Venezuela.

### Abstract

Grafting is a common practice in cacao cultivation, but it has not been reported whether rootstock-scion combinations respond differently in terms of water transport, growth, or nutrient uptake under varying soil water availability conditions. The effects of water deficit on water potential ( $\Psi_p$ ), basal diameter (bd), root growth, chlorophyll and leaf concentrations of nitrogen (N) were evaluated in 16 rootstock-scion combinations that resulted from four rootstocks and four scion clones. Grafted seedlings were subjected to two water regimes: 21 days without

Received: 30-09-2020 • Accepted: 05-01-2021

\*Corresponding author. [rjaimezarellano@gmail.com](mailto:rjaimezarellano@gmail.com)

irrigation (WD) and continuous irrigation (I). Under WD conditions,  $\Psi_f$  tended to be lower when using the EETP800 clone with the four rootstocks, indicating that this clone may have a higher rate of transpiration. The greater  $\Psi_f$  ( $p < 0.05$ ) obtained with the EET400 and EET399 rootstocks-scion combinations indicate higher water uptake capacity by the root systems of these rootstocks, which permits the maintenance of adequate transpiration rates and higher  $\Psi_f$ . The higher *bd*, chlorophyll content and leaf N content obtained in the combinations of scions with the EET400 rootstock under WD impart on this rootstock a more favorable degree of adaptability for tolerating water deficits. However, this tolerance is not associated with increased root growth, which indicates that higher efficiency of water uptake is related to metabolic and physiological processes rather than a larger root surface.

**Key words:** tolerance to water deficit, root system, grafting.

## Resumen

La injertación es una práctica común en cacao y hay limitada información sobre si las combinaciones patrón-injerto presentan diferentes respuestas hídricas, crecimiento y toma de nutrientes en diferentes condiciones de disponibilidad de agua. Los efectos del déficit hídrico sobre el potencial hídrico ( $\Psi_f$ ), diámetro basal (*bd*) y crecimiento radicular, clorofila y concentraciones foliares de nitrógeno (N) fueron evaluados en 16 combinaciones patrón-injerto que resultaron de cuatro patrones y cuatro injertos de clones. Plántulas injertadas fueron sometidas a dos regímenes de agua: 21 días sin riego (WD) y riego continuo (I). En condiciones de WD se encontró la tendencia de menores  $\Psi_f$  usando el clon EETP800 con los cuatro patrones. Mientras que los mayores  $\Psi_f$  ( $p < 0,05$ ) obtenidos en todas las combinaciones de los injertos con los patrones EET400 y EET399 indican una mejor capacidad de toma de agua por parte del sistema radicular de estos patrones, lo que permite mantener tasas transpiratorias adecuadas y mayores  $\Psi_f$ . Esto pudiera confirmar que en cacao los patrones pueden regular la capacidad hídrica. Las mayores *bd*, contenido de clorofila y contenido de N foliar obtenidos en las combinaciones con el patrón EET400 en WD le confieren una mejor capacidad de tolerancia al déficit hídrico, sin embargo esta capacidad no esta asociada a un mayor crecimiento radicular en déficit de agua, lo cual indica que la mayor eficiencia de toma de agua esta relacionada a procesos metabólicos - fisiológicos y no a una mayor superficie radicular que permita mayor toma de agua.

**Palabras clave:** tolerancia al déficit de agua, sistema radicular, injertación.

## Resumo

A enxertia é uma prática comum no cacau e não tem sido relatado se as combinações padrão-enxerto apresentam diferentes respostas hídricas, crescimento e absorção de nutrientes em diferentes condições de disponibilidade

de água. Os efeitos do déficit hídrico no potencial hídrico ( $\Psi_f$ ), diâmetro basal (bd) e crescimento radicular, clorofila e nitrogênio foliar (N) foram avaliados em 16 combinações padrão-enxerto que resultaram de quatro padrões e quatro enxertos ou clones. As mudas enxertadas foram submetidas a dois regimes de água: 21 dias sem irrigação (WD) e irrigação contínua (I). Sob condições WD, a tendência de menor  $\Psi_f$  foi encontrada usando o clone EETP800 com os quatro padrões, indicando uma taxa de transpiração mais alta que este clone pode ter. Enquanto os maiores  $\Psi_f$  ( $p < 0,05$ ) obtidos com os padrões EET 400 e EET399 indicam uma melhor capacidade de captação de água pelo sistema radicular desses padrões, o que permite manter taxas transpiratórias adequadas e maiores  $\Psi_f$ . Isso pode confirmar que no cacau os padrões podem regular a capacidade de água. Os maiores teores de bd, clorofila e N foliar obtidos nas combinações com o padrão EET400 em WD conferem-lhe uma melhor capacidade de tolerar o déficit hídrico, porém esta capacidade não está associada a um maior crescimento radicular no déficit hídrico, o que indica que a maior eficiência da absorção de água está relacionada a processos metabólico-fisiológicos e não a uma superfície radicular maior que permite maior absorção de água.

**Palavras-chave:** tolerância ao déficit hídrico, sistema radicular, enxertia.

## Introduction

In various cultivated species, scions can be grafted on to rootstocks to find rootstock-scion combinations that achieve better quality and higher production (Martínez-Ballesta *et al.*, 2010). Although successful combinations have been achieved, better understanding of the responses of rootstock-scion combinations to different abiotic and biotic factors and their effects on quality and production is still required (Baron *et al.*, 2019). Various combinations of rootstocks and scions differ in growth rates, tolerance to low and high temperatures, fruiting time, gas exchange rates and plant water conditions (Warschefsky *et al.*, 2016).

Rootstocks have been used in the propagation of cacao for the last 16 years (Irizarry and Goenaga, 2000),

## Introducción

Varias especies cultivadas, se pueden injertar para encontrar combinaciones patrón-injerto que logren una mejor calidad y una mayor producción (Martínez-Ballesta *et al.*, 2010). Aunque se han logrado combinaciones exitosas, aún se requiere una mejor comprensión de las respuestas de las combinaciones de portainjerto-injerto a diferentes factores abióticos y bióticos y sus efectos sobre la calidad y la producción (Baron *et al.*, 2019). Varias combinaciones de portainjertos e injertos difieren en tasas de crecimiento, tolerancia a temperaturas bajas y altas, tiempo de fructificación, tasas de intercambio de gases y condiciones hídricas de la planta (Warschefsky *et al.*, 2016).

Los portainjertos se han utilizado en la propagación del cacao durante

providing favorable results compared to direct seeding of twigs, in which hormones are used to promote root growth. Cacao rootstocks have been selected primarily for their tolerance to diseases caused by fungi in the soil, such as those caused by the fungal species *Ceratocystis cacaofunesta* and *Moniliophthora perniciosa*. Unlike with other crops, few studies have evaluated the rootstock-scion interaction. Recently, Ribeiro *et al.* (2016) found that the sensitivity of rootstocks to *C. perniciosa* can be modified through different rootstock-scion combinations. Yield differences among cacao rootstocks have previously been reported by Yin (2004) in Malaysia, where did not find rootstock-scion interaction affecting production characteristics; however, it is achieved better production with the clones evaluated using the rootstock SCA12 X SCA9 A, a scavina type material.

Current climatic changes may also modify the dynamics of rainfall, leading to the predominance of more humid environments and greater problems with flooding or declines in precipitation (Pautasso *et al.*, 2012). Therefore, there is a need to provide solutions for various climate scenarios. The use of grafting is an available option for which adaptation of rootstock-scion combinations to water deficits should be evaluated. This becomes more relevant in the context of climate change (Chaves *et al.*, 2016). Under water deficits, rootstocks can influence rates of gas exchange, which vary by rootstock-scion combination (Keller *et al.*, 2012).

los últimos 16 años (Irizarry y Goenaga, 2000), proporcionando resultados favorables en comparación con la siembra directa de ramillas, en la que se utilizan hormonas para promover el crecimiento de las raíces. Los portainjertos de cacao han sido seleccionados principalmente por su tolerancia a enfermedades causadas por hongos en el suelo, como las causadas por las especies de hongos *Ceratocystis cacaofunesta*. A diferencia de otros cultivos, pocos estudios han evaluado la interacción patrón-injerto. Recientemente, Ribeiro *et al.* (2016) encontraron que la sensibilidad de los portainjertos a *Moniliophthora perniciosa* se puede modificar mediante diferentes combinaciones de portainjerto-injerto. Las diferencias de rendimiento entre portainjertos de cacao han sido previamente reportadas por Yin (2004) en Malasia, donde no se encontró que la interacción portainjerto-injerto afectara las características de producción; sin embargo, se logró una mejor producción con los clones evaluados utilizando el patrón SCA12 X SCA9 A, un material tipo scavina.

Los cambios climáticos actuales también pueden modificar la dinámica de las lluvias, lo que lleva al predominio de ambientes más húmedos y mayores problemas de inundaciones o disminución de las precipitaciones (Pautasso *et al.*, 2012). Por lo tanto, existe la necesidad de brindar soluciones para diversos escenarios climáticos. El uso de injertos es una opción disponible para la cual se debe evaluar la adaptación de combinaciones de portainjerto-

Root conductivity depends to a great extent on aquaporins, which also take part in the modulation of the stomatal response. High tolerance to water deficit is also influenced by increase the concentration of abscisic acid (ABA) in the roots, which influences stomatal closure and hydraulic conductivity (Pantin *et al.*, 2012).

In Ecuador, higher frequencies of nights and days with high temperatures were reported during the 1951-2010 period, as well as an increase in consecutive days without rain and in frequency of extreme rainfall (Donat *et al.*, 2013). The question arises if the type of rootstock influences responses to water deficits by cacao, for which information is lacking on physiological mechanisms. Therefore, knowledge of the responses of rootstock-scion interaction to water availability would permit the elucidation of combinations that could be used in the following decades. Uptake of both water and nutrients by grafted plants depends on the lateral and vertical root systems (Martinez-Ballesta *et al.*, 2010). It is therefore essential to know how rootstock-scion interaction affects the assimilation of nutrients, which varies among seedlings of cacao clones during periods of water deficit (Santos *et al.*, 2014).

This work aims to evaluate water responses, changes in chlorophyll concentrations, leaf N, basal diameter and root growth among different rootstock-scion combinations of Ecuadorian cacao under both normal irrigation and water deficit conditions.

injerto a los déficits hídricos. Esto se vuelve más relevante en el contexto del cambio climático (Chaves *et al.*, 2016). En situaciones de déficit hídrico, los portainjertos pueden influir en las tasas de intercambio de gases, que varían según la combinación de portainjerto-injerto (Keller *et al.*, 2012). La conductividad hidráulica de la raíz depende en gran medida de las acuaporinas, que también intervienen en la modulación de la respuesta estomática. La alta tolerancia al déficit hídrico también se ve influenciada por el aumento de la concentración de ácido abscísico (ABA) en las raíces, que influye en el cierre estomático y la conductividad hidráulica (Pantin *et al.*, 2012).

En Ecuador, se reportaron mayores frecuencias de noches y días con altas temperaturas durante el período 1951-2010, así como un aumento en los días consecutivos sin lluvia y en la frecuencia de lluvias extremas (Donat *et al.*, 2013). Surge la pregunta de si el tipo de portainjerto influye en las respuestas a los déficits hídricos del cacao, para lo cual se carece de información sobre los mecanismos fisiológicos. Por tanto, el conocimiento de las respuestas de la interacción portainjerto-injerto a la disponibilidad de agua permitiría dilucidar combinaciones que podrían utilizarse en las próximas décadas. La absorción tanto de agua como de nutrientes por las plantas injertadas depende de los sistemas de raíces laterales y verticales (Martinez-Ballesta *et al.*, 2010). Por ello, es fundamental conocer cómo la interacción portainjerto-injerto afecta la asimilación de nutrientes, la



## Material and methods

### Plant material: rootstocks and scions

Seeds of rootstocks EET 399, EET 400, IMC 67 and CCN51 were obtained from fruits resulting from open pollination. The first three rootstocks were selected based on their resistance to *Ceratocystis cacaofunesta*. These rootstocks have shown low yields. CCN 51 was selected because its use is becoming widespread in Ecuador, despite this clone not having tolerance to *C. cacaofunesta*, but its precocity and high production have been demonstrated (Boza *et al.*, 2014). Fruits were taken from trees planted at the Pichilingue Tropical Experimental Station (1°4'33" S, 79°29'15" W, elevation 110 m) of the National Research Institute (INIAP) in Quevedo, Ecuador. Seeds were sown in 16 kg. bags filled with black soil for a total of 80 seedlings per rootstock. Clones EETP 800, EETP 801, T12 and T24 (4 clones) were selected as scions, all of them of the Nacional type according classification of Motamayor *et al.* (2008). The first two were recently released by INIAP (Loor *et al.*, 2019), and the last ones were obtained from crosses of pre-selected Nacional-type clones based on characteristics of productivity and tolerance to diseases with CCN 51 clone. These clones are still under evaluation of yield and disease tolerance (Jaimez *et al.*, 2018; Jaimez *et al.*, 2020). At 126 days after sowing, when the seedlings had between six to eight leaves, seedlings of each rootstock were grafted with different scions using the bud grafting method. In total were 16 combinations

cual varía entre plántulas de clones de cacao durante períodos de déficit hídrico (Santos *et al.*, 2014). Este trabajo tiene como objetivo evaluar las respuestas al agua, los cambios en las concentraciones de clorofila, el N de las hojas, el diámetro basal y el crecimiento de las raíces entre diferentes combinaciones patrón-injerto del cacao ecuatoriano tanto en condiciones normales de riego como de déficit hídrico

## Materiales y métodos

### Material vegetal: portainjertos e injertos

Se obtuvieron semillas de los portainjertos EET 399, EET 400, IMC 67 y CCN51 a partir de frutos resultantes de la polinización abierta. Los tres primeros portainjertos se seleccionaron en función de su resistencia a *C. cacaofunesta*. Estos portainjertos han mostrado bajos rendimientos. Se seleccionó CCN 51 porque su uso se está generalizando en Ecuador, a pesar de que este clon no tiene tolerancia a *C. cacaofunesta*, pero se ha demostrado su precocidad y alta producción (Boza *et al.*, 2014). Los frutos se tomaron de árboles plantados en la Estación Experimental Tropical Pichilingue (1° 4 '33"S, 79° 29' 15 " W, elevación 110 m) del Instituto Nacional de Investigaciones (INIAP) en Quevedo, Ecuador. Las semillas se sembraron en bolsas de 16 kg llenas de tierra negra para un total de 96 plántulas por patrón. Se seleccionaron como injertos los clones EETP 800, EETP 801, T12 y T24, todos ellos del tipo Nacional según clasificación

(4 rootstocks x 4 scions) and 24 plant per combination. The grafted plants were kept in a greenhouse and watered every two or three days and fertilized each bag every 15 days with 15 g of a commercial formula (12-15-12 NPK + micronutrients). During the period of the experiment when plants were in the greenhouse, the maximum average temperature was 27.5 °C, and the minimum was 22 °C. Values for maximum and minimum average relative humidity were 92 and 61%, respectively. The inner part of the greenhouse roof had a mesh radiation absorption of 50%.

At 90 days after the grafting, when grafted plants had at least 6-8 leaves, half of the plants in each combination were not irrigated (water deficit treatment, WD), while the other half were irrigated (I), keeping the soil at 80% of field capacity. WD was established by decreasing gradually water availability from 80% to 40% of field capacity, which was achieved after up to 21 days without irrigation. The combinations were distributed in a completely randomized design.

#### **Determination of water potential, leaf nitrogen concentration, chlorophyll and root growth**

At 18 days after the water availability experiment began, leaf water potential ( $\Psi_p$ ) measurements were carried out between 12:00-13:00 h. with a Scholander pressure chamber (Model 615, PMS Instrument). For each combination, four plants randomly selected were measured. At 21 days, in 4 plants randomly selected the basal diameter (bd) and the

de Motamayor *et al.* (2008). Los dos primeros fueron lanzados recientemente por el INIAP (Loor *et al.*, 2019), y los últimos se obtuvieron a partir de cruces de clones tipo National, preseleccionados en función de características de productividad y tolerancia a enfermedades con el clon CCN 51. Estos clones aún están bajo evaluación de rendimiento y tolerancia a enfermedades (Jaimez *et al.*, 2018; Jaimez *et al.*, 2020). A los 126 días después de la siembra, cuando las plántulas tenían entre seis y ocho hojas, las plántulas de cada portainjerto fueron injertadas con los diferentes clones utilizando el método de injerto lateral. En total fueron 16 combinaciones (4 portainjertos x 4 injertos) y 24 plantas por combinación. Las plantas injertadas se mantuvieron en invernadero y se regaron cada dos o tres días y se fertilizaron cada 15 días con 15 g de una fórmula comercial (12-15-12 NPK + micronutrientes). Durante el período del experimento cuando las plantas estuvieron en el invernadero, la temperatura promedio máxima fue de 27,5 ° C y la mínima fue de 22 ° C. Los valores de humedad relativa promedio máxima y mínima fueron 92 y 61%, respectivamente. La parte interior del techo del invernadero tenía una malla de 50% de absorción de radiación.

A los 90 días después de la injertación, cuando las plantas injertadas tenían al menos 6-8 hojas, la mitad de las plantas de cada combinación no se regaron (tratamiento de déficit hídrico, WD), mientras que la otra mitad se regó (I), manteniendo el suelo

chlorophyll content was measured. Basal diameter was measured at 5 cm. above the surface and the amount of chlorophyll in the leaf was measured with a chlorophyll meter SPAD (Minolta SPAD 502 model). The SPAD-502 meter measures the transmittance of red and infrared radiation through the leaf, and calculates a SPAD value which is an indirect measurement of chlorophyll content. Mature leaf samples were taken from the same four plants per combinations and were dried at 70°C at constant weight. They were ground and passed through a 0.01 cm sieve. The concentration of N was obtained following the Kjeldahl method. The volume of the taproot and branch roots was measured by immersing the roots in a cylinder with a known volume of water, measuring the increase in volume once the sample was introduced (Santos *et al.*, 2014). The ratio of branch roots to taproot roots (BR/TR) was calculated.

Data were expressed as means and corresponding standard errors. Differences in variables were analyzed by analysis of variance and Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ) was used to evaluate significance of effects of water conditions on rootstock-scion combinations.

## Results and discussion

Visible symptoms of chlorosis and leaf drops were observed only in plants of all combinations of EET 399, IMC 67 and CCN 51 rootstocks subjected to water deficit, while no chlorosis or leaf drops were observed with EET 400

en 80% de la capacidad de campo. La WD se estableció disminuyendo gradualmente la disponibilidad de agua del 80% al 40% de la capacidad del campo, lo que se logró después de 21 días sin riego. Las combinaciones se distribuyeron en un diseño completamente al azar.

### Determinación del potencial hídrico, concentración de nitrógeno foliar, clorofila y crecimiento radicular

A los 18 días de iniciado el experimento de disponibilidad de agua, se realizaron mediciones del potencial hídrico foliar ( $\Psi_p$ ) entre las 12:00 y las 13:00 horas con una cámara de presión Scholander (Modelo 615, PMS Instrument). Para cada combinación, se midieron cuatro plantas seleccionadas al azar. A los 21 días, en 4 plantas seleccionadas al azar se midió el diámetro basal (bd) y el contenido de clorofila. El diámetro basal se midió a 5 cm sobre la superficie y la cantidad de clorofila en la hoja se midió con un medidor de clorofila SPAD (modelo Minolta SPAD 502). El medidor SPAD-502 mide la transmitancia de la radiación roja e infrarroja a través de la hoja y calcula un valor SPAD que es una medida indirecta del contenido de clorofila. Se tomaron muestras de hojas maduras de las mismas cuatro plantas por combinación y se secaron a 70 ° C a peso constante. Se molieron y se pasaron por un tamiz de 0,01 cm. La concentración de N foliar se obtuvo siguiendo el método de Kjeldahl. El volumen de la raíz pivotante y de las raíces secundarias se midió sumergiendo las raíces en un cilindro

rootstock in combinations with the different scions under water deficit. Irrigated plant not showed chlorosis symptoms.

### Water leaf potential and chlorophyll

At 18 days, the irrigated seedlings in all combinations maintained  $\Psi_f$  between -0.9 and -1.3 MPa with not significant differences (Figure 1A). The combinations under water deficit varied in  $\Psi_f$ . In general, after 18 days without irrigation, all combinations showed  $\Psi_f$  less than -1.5 MPa (Figure 1B). The EETP800 scion exhibited the most negative values of  $\Psi_f$  with all rootstocks. The combination IMC67-T24 showed the highest  $\Psi_f$  (-1.4 MPa) but also with the combination IMC67-EETP 800 the lowest  $\Psi_f$  was obtained (figure 1B). Combinations with rootstock EET399 and EET 400 exhibited significant higher  $\Psi_f$  (-1.88 and -2.06 MPa, respectively) that combinations with rootstocks IMC67 (-2.27 MPa) and CCN51. (-2.24 MPa).

The low  $\Psi_f$  trend observed for the EETP800 clone with the four rootstocks indicates that this clone may have a higher transpiration rate. The higher  $\Psi_f$  mean obtained with rootstocks EET 400 and EET399 indicate these rootstocks have physiological mechanisms to preserve water either through stomatal closures or a greater intake of water through its roots. Similar to our results, García and Moreno (2015) found that  $\Psi_f$  of seedlings of three clones grafted on IMC 67 decreased as levels of available soil water diminished. Additionally, there was a reduction in stomatal conductance, which reduced the assimilation of CO<sub>2</sub> rate.

con un volumen de agua conocido, midiendo el aumento de volumen una vez introducida la muestra (Santos *et al.*, 2014). Se calculó la relación entre las raíces de las raíces secundarias y las raíces pivotantes (BR / TR).

Los datos se expresaron como medias y errores estándar correspondientes. Las diferencias en las variables se analizaron mediante análisis de varianza y se utilizó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para evaluar la significancia de los efectos de las condiciones del agua en las combinaciones de portainjerto-injerto.

### Resultados y discusión

Los síntomas visibles de clorosis y caída de hojas se observaron solo en plantas de todas las combinaciones de los portainjertos EET 399, IMC 67 y CCN 51 sometidas a déficit hídrico, mientras que no se observaron clorosis ni caída de hojas con el portainjerto EET 400 y sus combinaciones con los diferentes clones en el tratamiento de déficit hídrico. Las plantas regadas no presentaron síntomas de clorosis.

### Potencial hídrico foliar de agua y clorofila

A los 18 días, las plántulas regadas en todas las combinaciones mantuvieron  $\Psi_f$  entre -0,9 y -1,3 MPa sin diferencias significativas (figura 1A). Las combinaciones bajo déficit hídrico variaron en  $\Psi_f$ . En general, después de 18 días sin riego, todas las combinaciones mostraron  $\Psi_f$  menos de -1,5 MPa (figura 1B). El injerto EETP800 exhibió los valores más negativos de  $\Psi_f$  con todos los patrones. La combinación IMC67-T24 mostró los

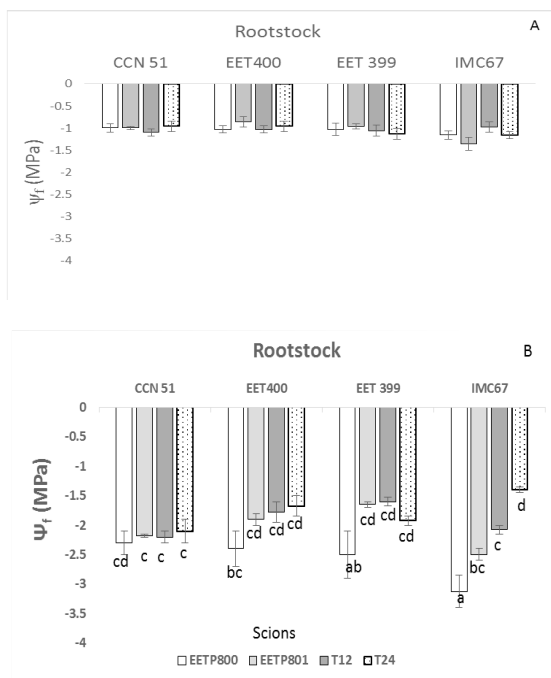


Figure 1. Leaf water potentials ( $\Psi_f$ ) of rootstocks-scions seedlings combinations at 18 days with irrigation (A) and without irrigations (B). Bars mean standard error. Different letters in each soil water condition indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) according to Tukey's test.

Figura 1: Potenciales hídricos foliares ( $\Psi_f$ ) de combinaciones de portainjertos con 4 tipos de clones de cacao a los 18 días con riego (A) y sin riego (B). Barras significan error estándar. Diferentes letras en cada condición de agua del suelo indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según la prueba de Tukey.

This seems to confirm that rootstocks in cacao can regulate the water transport ability of the plant, as reported by Goncalves *et al.* (2006) for sweet cherry. In conditions of high evaporative demand, this trait would avoid the rapid wilting that was observed in the combinations with the rootstocks IMC 67 and CCN51 and consequent seedling deaths.

#### Chlorophyll, Leaf nitrogen and basal diameter

Rootstock EET400 had the highest means in WD for chlorophyll, and

$\Psi_f$  más altos (-1,4 MPa), mientras que con la combinación IMC67-EETP 800 se obtuvo el  $\Psi_f$  más bajo (figura 1B). Las combinaciones con los portainjertos EET399 y EET 400 exhibieron  $\Psi_f$  significativamente mayores (-1,88 y -2,06 MPa, respectivamente) que las combinaciones con los portainjertos IMC67 (-2,27 MPa) y CCN51. (-2,24 MPa).

La tendencia de bajos  $\Psi_f$  observada para el clon EETP800 con los cuatro patrones indica que este clon puede tener una mayor tasa de transpiración.

leaf N concentration in combination with different scions. For example, for chlorophyll content of rootstock EET 400 showed the highest and most significant values of SPAD (35.3) in relation to the other three rootstocks, while the rootstock CCN 51 showed significantly lower SPAD (20.9) (Table 1). Similarly, for the concentration of leaf N and bd, significantly higher values of 2% and 11.6 mm, were achieved with the EET 400 rootstock. Under irrigation conditions the combination EET 400-EETP 800 had the highest SPAD (49.7), while other combinations showed similar values (figure 2A). Under conditions of water deficit, the EET 400-EETP 800, EET 400-EETP801 and EET 400-T12 combinations showed the most significant and highest SPAD values. CCN51 with T12 was the combination with the lowest SPAD value (figure 2B).

La media de  $\Psi_f$  más alta obtenida con los portainjertos EET 400 y EET399 indican que estos portainjertos tienen mecanismos fisiológicos para preservar el agua ya sea mediante cierres estomáticos o una mayor toma de agua a través de sus raíces. De manera similar a nuestros resultados, García y Moreno (2015) encontraron que  $\Psi_f$  de plántulas de tres clones injertados en IMC 67 disminuyeron a medida que disminuían los niveles de agua del suelo disponible. Además, hubo una reducción en la conductancia estomática, lo que redujo la tasa de asimilación de  $CO_2$ . Esto parece confirmar que los portainjertos del cacao pueden regular la capacidad de transporte de agua de la planta, coincidiendo con lo reportado por Goncalves *et al.* (2006) para cereza dulce. En condiciones de alta demanda evaporativa, este rasgo evitaría el rápido marchitamiento que se

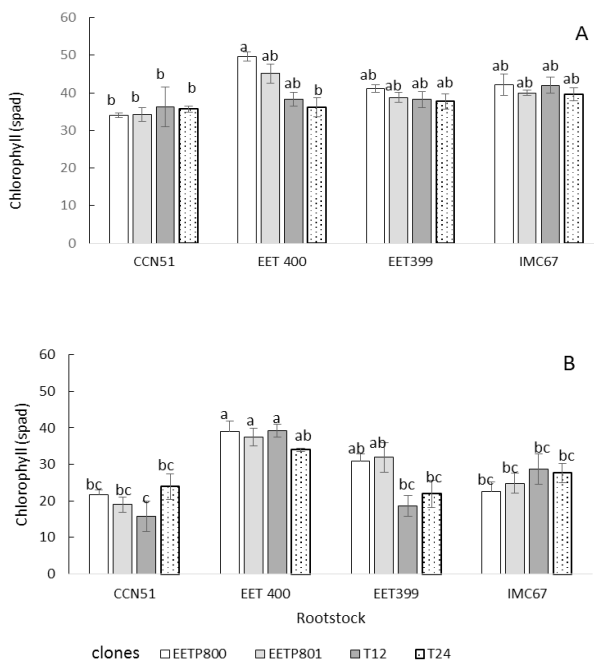
**Table 1. Means of chlorophyll, leaf N concentration and basal diameter (bd) in four 4 types of rootstocks grafted with four different clones (EETP 800, EETP 801, T12 and T24) submitted to irrigation and 21-day period without irrigation.**

**Cuadro 1. Promedios de clorofila, concentración de N foliar y diámetro basal (bd) en cuatro 4 tipos de portainjertos injertados con cuatro clones diferentes (EETP 800, EETP 801, T12 y T24) sometidos a riego y período de 21 días sin riego.**

Rootstock	Chlorophyll (SPAD)	Irrigated		Not irrigated		
		leaf N (%)	bd (mm)	Chlorophyll (SPAD)	leaf N (%)	bd (mm)
EET 40	39.8±0.6a	2.1±0.3a	12.0±0.9a	35.3±1.5a	2.2± 0.3a	11.6±0.5a
IMC 67	38.6±0.5b	2.0±0.5ab	10.1±1.2a	24.4±2.2b	1.7±0.4b	9.8±0.7b
EET 399	37.2±1.2b	2.0± 0.8ab	11.7±1.2a	24.0±1.8b	1.7±0.3b	10.1±0.6b
CCN51	35.0±1.3c	1.8±0.7b	11.4±1.1a	20.9±1.9c	1.6±0.4b	10.0±0.9b

Different letters in the same column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) according to Tukey's test. Means values ± standard error.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según la prueba de Tukey. Valores de medias ± error estándar.



**Figure 2. Concentration of chlorophyll in cacao seedlings of rootstocks combined with 4 types of clones in irrigation conditions (A) and water deficit of 21 days (B).** Bars indicate the standard error of the mean, different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) according to Tukey test.

**Figura 2. Concentración de clorofila en plántulas de combinaciones de portainjertos combinados con 4 tipos de clones de cacao en condiciones de riego (A) y déficit hídrico de 21 días (B).** Las barras indican el error estándar de la media, letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) según la prueba de Tukey.

The WD plants produced lower leaf contents of N in all combinations. Under irrigation, the only differences were between the combination EET 400-EETP 800 with the highest value ( $21.2 \text{ mg.g}^{-1}$ ) and the combination CCN51-T12 with the lowest value ( $18.1 \text{ mg.g}^{-1}$ ) (figure 3A). Under WD conditions, combinations of EET 400 with different scions were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the CCN51-T12 combination (figure 3B). There were no differences in N among the combinations in irrigated plants, (figure 4A), whereas

observó en las combinaciones con los portainjertos IMC 67 y CCN51 y las consecuentes muertes de plántulas.

### Clorofila, nitrógeno foliar y diámetro basal

El portainjerto EET400 presentó los promedios más altos en condiciones de WD para clorofila y concentración de N en las hojas en combinación con los diferentes injertos. Por ejemplo, para el contenido de clorofila el patrón EET 400 mostró los valores más altos y significativos de SPAD (35.3) en relación a los otros tres patrones, mientras que el patrón CCN 51 mostró



with WD, the bd values of the combinations of rootstocks CCN51 and EET 399 with the scion T24 were significantly lower ( $p < 0.05$ ) than combinations of the EET 400 rootstock with EETP 800, EETP 801 and T24 and combinations of EET 399 rootstock with EETP 800 and EETP 801 scions (Figure 4B).

SPAD significativamente menores en déficit hídrico (20.9) (Cuadro 1). De manera similar, para la concentración de N en las hojas y bd, se obtuvieron valores significativamente mayores de 2% y 11,2 mm, con el patrón EET 400. En condiciones de riego, la combinación EET 400-EETP800 tuvo el SPAD más alto (49,7), mientras

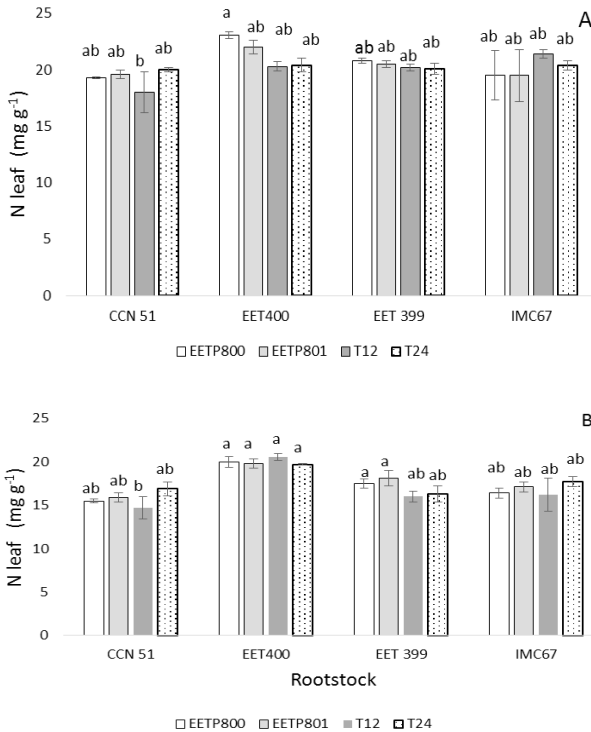


Figure 3. Concentration of leaf Nitrogen of seedlings combinations of 4 rootstocks with 4 types of scion in irrigation conditions (A) and water deficit of 21 days (B). Bars indicate the standard error of the mean, different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) according to the Tukey test.

Figura 3. Concentración de nitrógeno foliar de plántulas de combinaciones de 4 portainjertos injertadas con 4 tipos de clones en condiciones de riego (A) y déficit hídrico de 21 días (B). Las barras indican el error estándar de la media, letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según la prueba de Tukey.

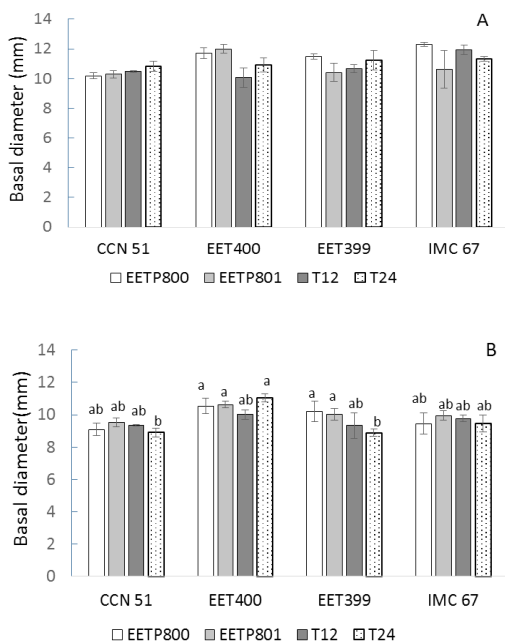


Figure 4. Basal diameter of 4 rootstocks with 4 types of scions of cacao combinations under irrigation conditions (A) and 21-day water deficit (B). Bars indicate the standard error of the mean, different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) according to Tukey's test.

Figura 4. Diámetro basal de combinaciones 4 portainjertos injertados con 4 tipos de clones de cacao en condiciones de riego (A) y déficit hídrico de 21 días (B). Las barras indican el error estándar de la media, letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según la prueba de Tukey.

Highest significant ( $p < 0.05$ ) average values were obtained for the concentration of leaf nitrogen, chlorophyll and *bd* with the EET 400 rootstock under water deficit conditions. With the use of EET 400, high production has already been achieved with several scions (Goenaga *et al.*, 2015), which suggests that this rootstock has characteristics that allow it to be combined with a high number of clones and maintain high production. In addition to

que otras combinaciones mostraron valores similares (figura 2A). En condiciones de déficit hídrico, las combinaciones EET 400-EETP800, EET 400-EETP801 y EET 400-T12 mostraron los valores SPAD más altos y significativos. CCN51 con T12 fue la combinación con el valor SPAD más bajo (figura 2B).

Las plantas en déficit hídrico mostraron menores contenidos de N en las hojas en todas las combinaciones. Bajo riego, las únicas diferencias fueron entre la combinación EET

its tolerance to *C. cacaofunesta*, this rootstock has the additional advantage of greater tolerance to water deficit, which is important in the seedling stage, when they are likely more affected by water deficits due to poor root development (Carr and Lookwood, 2011). In the case of the coastal Ecuadorian region, approximately 60% of the plantations lack irrigation systems, and, although the six-month drought period is characterized by high cloud coverage maintaining high humidity and low relative evaporative demands, during the last two months of the drought,  $\Psi_r$  of adult tree can reach -1.6 MPa (Orchard, 1985).

In general, in the WD condition, chlorophyll and bd decreased; however, the significance of the effect of WD varied among combinations. With the exception of the EET 400-EETP 800 combination, the other combinations with this rootstock not showed significant differences in SPAD between irrigated plants and those subjected to WD. The decreases in bd due to WD were significant for CCN 51 with T12 and T24, IMC 67 with EETP 800 and T12, EET 399 with EETP 800 and T24, and EET 400 with EETP 800 and EETP 801 (Table 2). The combinations CCN51 with EETP 800 and EETP801, rootstock IMC67 with T12 and T24, rootstock EET399 with EETP 800, T12 and T24 and EET 400 with EETP 800 presented significant lower N content values under WD.

400-EETP 800 con el valor más alto (21,2 mg.g<sup>-1</sup>) y la combinación CCN51-T12 con el valor más bajo (18,1 mg.g<sup>-1</sup>) (figura 3A). En condiciones de WD, las combinaciones de EET 400 con diferentes clones fueron significativamente más altas ( $P < 0,05$ ) que la combinación CCN51-T12 (figura 3B). No hubo diferencias en bd entre las combinaciones en plantas regadas, (figura 4A), mientras que en condiciones de déficit hídrico, los valores de bd de las combinaciones de portainjertos CCN51 y EET 399 con el injerto T24 fueron significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que las combinaciones del portainjerto EET 400 con EETP800, EETP 801 y T24 y combinaciones del portainjerto EET 399 con clones EETP 800 y EETP801 (figura 4B).

Los valores promedios más altos y significativos ( $p < 0,05$ ) fueron obtenidos para la concentración de nitrógeno en las hojas, clorofila y bd con el portainjerto EET 400 en condiciones de déficit hídrico. Con el uso de EET 400 ya se ha obtenido alta producciones con varios injertos (Goenaga *et al.*, 2015), lo que sugiere que este portainjerto tiene características que le permiten combinarse con un elevado número de clones y mantener una alta producción. Además de su tolerancia a *C. cacaofunesta*, este portainjerto tiene la ventaja adicional de una mayor tolerancia al déficit hídrico, lo cual es importante en la etapa de plántula, cuando es probable que se vean más afectados por déficits hídricos debido al menor desarrollo radicular (Carr y Lookwood, 2011). En el caso de la región costera

**Table 2. Chlorophyll (SPAD), basal diameter (mm), and leaf N concentration (mg.plant<sup>-1</sup>) in combinations of rootstock with different scion of cacao in irrigation conditions (I) and water deficit (WD) of 21 days.****Cuadro 2. Clorofila (SPAD), diámetro basal (mm) y concentración de N foliar (mg.planta<sup>-1</sup>) en combinaciones de portainjerto- clones de cacao en condiciones de riego (I) y déficit hídrico (WD) de 21 días.**

Rootstock	Scion	SPAD		bd		N	
		I	WD	I	WD	I	WD
CCN51	EETP800	34.0±0.6	21.8±1.2*	10.2±0.2	9.1±0.4	19.3±0.1	15.5±0.2*
	EETP801	34.3±1.8	19.0±2.2*	10.3±0.2	9.5±0.3	19.6±0.1	15.9±0.5*
	T12	36.4±5.4	15.8±4.1*	10.5±0.8	9.4±0.1*	18.0±1.8	14.7±1.3
	T24	35.7±0.9	23.9±3.4*	10.8±0.3	8.9±0.3*	20.0±0.2	16.9±0.8
IMC67	EETP800	42.1±2.8	22.6±2.6*	12.4±0.1	9.5±0.7*	19.5±2.2	16.4±0.6
	EETP801	40.0±0.7	24.8±2.7*	10.6±1.2	10.0±0.3	19.5±2.3	17.1±0.6
	T12	42.0±2.2	28.7±4.2*	11.9±0.3	10.0±0.2*	21.4±0.4	16.2±1.9*
	T24	39.6±1.7	27.6±2.7*	11.3±0.1	9.5±0.5	20.4±0.4	17.7±0.6*
EET 399	EETP800	41.1±1.1	30.8±2.1*	11.5±0.2	10.2±0.6*	20.8±0.1	17.7±0.5*
	EETP801	38.8±1.2	31.9±4.0	10.4±0.6	10.0±0.4	20.5±0.3	18.1± 0.9
	T12	38.2±2.1	18.7±2.8*	10.7±0.3	9.3±0.2	20.2±0.3	16.0±0.6*
	T24	37.7±2.1	21.9±3.7*	11.2±0.7	8.9±0.5*	20.1±0.8	16.3±0.9*
EET 400	EETP800	49.7±1.2	39.1±2.7*	11.7±0.4	10.5±0.5*	23.1±0.3	20.0±0.6*
	EETP801	45.1±2.6	37.5±2.3	12.0±0.3	10.6±0.2*	22.0±0.6	19.8±0.5
	T12	38.3±1.9	39.3±1.8	10.1±0.7	10.0±0.3	20.3±0.4	20.6±0.4
	T24	36.2±2.5	34.0±0.5	10.9±0.5	11.1±0.2	20.4±0.6	19.7±0.1

\* Significant differences ( $p < 0.05$ ) according to students t-test between I and WD treatments for rootstock-scion combinations. Means of four values  $\pm$  standard error

\* Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) según la prueba t de Student entre los tratamientos I y WD para combinaciones de portainjerto-vástago. Medias de cuatro valores  $\pm$  error estándar.

Most of the combinations exhibited a lower leaf N concentration with the water deficit. This difference may be related to the absorption capacity of the different rootstock-scion combinations, depending on the availability of water in the soil. These differences among clones have also been observed in cacao (Santos et al., 2014), tomato (*Lycopersicon esculentum*) and eggplant (*Solanum melongena*) (Leonardi and Gioffrida, 2006). In melon (*Cucumis melo*), the

ecuatorial, aproximadamente el 60% de las plantaciones carecen de sistemas de riego y, si bien el período de sequía de seis meses se caracteriza por una alta nubosidad que mantiene alta humedad y bajas demandas de evaporación relativa, durante los últimos dos meses de la sequía, el  $\Psi_f$  del árbol adulto puede alcanzar -1,6 MPa (Orchard, 1985).

En general, en la condición de WD, la clorofila y el bd disminuyeron; sin embargo, la significancia del efecto de

rootstock has a direct influence on the absorption of N in combinations with different cultivars. Differences in the interactions between rootstocks and grapefruit cultivars (*Citrus paradisi*) have also been reported (Sharma *et al.*, 2016). Apparently the compatibility between the rootstock and the cacao clone influences the absorption of different nutrients which have been reported for woody fruit species (Baron *et al.*, 2019).

**Root volume**

Water deficit did not affect the growth of the taproot in any of the rootstocks. However, the volume of branch roots decreased significantly ( $p < 0.05$ ) by approximately 50%, except for with EET 400, which was not affected (table 3). The ratio of branch roots to taproot roots (BR/TR) tended to decrease in all rootstocks under WD but was only significant in EET 399, reaching values of 55% (table 3).

WD varió entre combinaciones. Con la excepción de la combinación EET 400-EETP 800, las otras combinaciones con este patrón no mostraron diferencias significativas en SPAD entre plantas regadas y sometidas a WD. Las disminuciones en bd debido a WD fueron significativas para CCN 51 con T12 y T24, IMC 67 con EETP 800 y T12, EET 399 con EETP 800 y T24, y EET 400 con EETP 800 y EETP 801 (Tabla 2). Las combinaciones CCN51 con EETP 800 y EETP801, IMC67 con T12 y T24, EET399 con EETP 800, T12 y T24 y EET 400 con EETP 800 presentaron valores de contenido de N significativamente menores bajo WD.

La mayoría de las combinaciones exhibieron una menor concentración de N en las hojas con el déficit hídrico. Esta diferencia puede estar relacionada con la capacidad de absorción de las diferentes combinaciones patrón-injerto, dependiendo de la disponibilidad de

**Table 3. Root volume (cm<sup>3</sup>.plant<sup>-1</sup>) of taproot and branch root, relationship branch roots / taproot root (BR /TR) in four 4 types of rootstocks grafted with four different clones (EETP 800, EETP 801, T12 and T24) submitted to irrigation (I) and 21-day period without irrigation (WD).**

**Cuadro 3. Volumen de raíz pivotante y raíces secundarias (cm<sup>3</sup>.planta<sup>-1</sup>), relación raíces secundarias/raíz pivotante (BR / TR) en cuatro 4 tipos de portainjertos injertados con cuatro clones diferentes (EETP800, EETP801, T12 y T24 ) sometidos a riego (I) y período de 21 días sin riego (WD).**

Rootstock	Taproot root		Branch root		BR/TR	
	I	WD	I	WD	I	WD
CCN51	14.0 ± 2.9	12.5 ± 2.6	23.0 ± 3.7	14.6 ± 1.4*	1.7±0.2	1.3±0.3
IMC67	18.8 ± 1.9	12.9 ± 3.0	27.0 ± 3.0	14.5 ± 2.8*	1.5±0.2	1.2±0.2
EET399	14.3 ± 1.7	12.8 ± 1.4	26.3 ± 5.8	12.8 ± 0.5*	1.8±0.3	1.0±0.1*
EET400	13.8 ± 0.9	11.0 ± 0.6	17.3 ± 3.7	11.3 ± 1.5	1.3±0.3	1.0±0.3

\* Significant differences ( $p < 0.05$ ) according to students t-test between I and WD treatments for rootstock-scion combinations. Means of four values ± standard error.

\* Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según la prueba t de Student entre los tratamientos I y WD para combinaciones de portainjerto-vástago. Medias de cuatro valores ± error estándar.

The maintenance of the branch roots during the water deficit of the rootstock EET400 indicates the ability to maintain a greater water intake and the tolerance to water deficit probably is influenced by physiological characteristics of the roots, such as their hydraulic conductivity and their osmotic adjustment, and not so much due to the growth of the roots which is consistent with observations reported by Barrios-Masias *et al.* (2015) with grapevine scions. Apparently the tendency for lower BR/TR exhibited by EET 400 indicates the existence of mechanisms that allow more favorable water intake, which could be mediated by greater hydraulic conductivity and regulation of aquaporins to maintain high permeability and water transport, permitting greater tolerance in conditions with low availability of soil water (Gambetta *et al.*, 2017). Rootstocks are known to affect the ability of grapevines to supply water for shoot transpiration demand, while the scions regulate stomatal aperture (Tramontini *et al.*, 2013); therefore, the interaction of rootstock and scion determines hydraulic properties.

## Conclusions

The EET400 rootstock exhibited a better capacity to tolerate water deficit than did the others three rootstocks. Along with its resistance to *M. cacaofunesta*, this finding suggests its use as a standard rootstock in the central areas of the Ecuadorian coast. Its higher tolerance is related to a greater capacity for water absorption mediated probably

agua en el suelo. Estas diferencias entre clones también se han observado en cacao (Santos *et al.*, 2014), tomate (*Lycopersicon esculentum*) y berenjena (*Solanum melongena*) (Leonardi y Gioffrida, 2006). En melón (*Cucumis melo*), el portainjerto tiene una influencia directa en la absorción de N en combinaciones con diferentes cultivares. También se han reportado diferencias en las interacciones entre portainjertos y cultivares de pomelo (*Citrus paradisi*) (Sharma *et al.*, 2016). Aparentemente, la compatibilidad entre el portainjerto y el clon de cacao influye en la absorción de diferentes nutrientes que también se han reportado para especies de frutos leñosos (Baron *et al.*, 2019).

## Volumen de la raíz

El déficit hídrico no afectó el crecimiento de la raíz pivotante en ninguno de los portainjertos. Sin embargo, el volumen de las raíces secundarias disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) en aproximadamente un 50%, excepto con EET 400, que no se vio afectado (tabla 3). La proporción de raíces secundarias a raíces pivotantes (BR / TR) tendió a disminuir en todos los patrones bajo WD pero solo fue significativa en EET 399, alcanzando valores de 55% con respecto a las regadas (Cuadro 3).

La no disminución significativa de las raíces secundarias durante el déficit hídrico del portainjerto EET400 indica la capacidad de mantener un mayor aporte hídrico y su tolerancia al déficit hídrico al parecer está relacionada por características fisiológicas de las raíces, como su conductividad hidráulica y su ajuste osmótico, y no

by metabolic mechanisms, which permits a higher concentration of leaf nitrogen, chlorophyll and bd growth during the first periods of growth than in other rootstocks. Field studies are required to identify the subsequent stress tolerance of rootstock-scion combinations and its relationship with production parameters under different ecological conditions.

### Acknowledgment

This research is part of the project No PYTEXT1095-2019-FIAG0003: "Interactions between rootstock and scions of cacao: physiological and molecular responses to water deficit", Universidad Técnica de Manabí. The authors thanks the logistical support of the Pichilingue Tropical Experimental Station of INIAP, Ecuador.

---

### *End of English Version*

---

tanto debido a un mayor crecimiento de las raíces lo cual es consistente con las observaciones reportadas por Barrios-Macias *et al.* (2015) con injertos de uva. Aparentemente la tendencia a menor BR / TR exhibida por EET 400 indica la existencia de mecanismos que permiten una captación de agua más favorable, lo que podría también estar mediado por una mayor conductividad hidráulica y regulación de las acuaporinas para mantener alta permeabilidad y transporte de agua, permitiendo una mayor tolerancia en condiciones con baja disponibilidad de agua del suelo (Gambetta *et al.*, 2017). Se sabe que los portainjertos afectan

la capacidad de suministrar agua para la demanda de transpiración de los brotes superiores en uva, mientras que los injertos regulan la apertura de los estomas (Tramontini *et al.*, 2013); por lo tanto, la interacción del portainjerto y el injerto determina las propiedades hidráulicas.

### Conclusiones

El portainjerto EET400 exhibió una mejor capacidad para tolerar el déficit hídrico que los otros tres portainjertos. Junto a su resistencia a *C. cacaofunesta*, este hallazgo sugiere su uso como patrón estándar en las zonas centrales de la costa ecuatoriana. Su mayor tolerancia está relacionada con una mayor capacidad de absorción de agua mediada probablemente por mecanismos metabólicos, lo que permite una mayor concentración de nitrógeno foliar, clorofila y crecimiento de bd durante los primeros periodos de crecimiento que otros portainjertos. Se requieren estudios de campo para identificar la tolerancia al estrés de las combinaciones patrón-injerto y su relación con los parámetros de producción en diferentes condiciones ecológicas.

### Cited literature

- Baron, D., A. C. Amaro, A. Pina and G. Ferreira. 2019. An overview of grafting re-establishment in woody fruit species. *Sci. Horticulturae* 243: 84-91.
- Barrios-Macias, F.H, T. Knipfer and A.J. Mc Elrone. 2015. Differential responses of grapevine rootstocks to water stress are associated with adjustments in fine root hydraulic physiology and suberization. *J. Exp. Bot.* 66: 6069–6078.



- Boza, E., J. Motamayor, F. Amores, A. Cedeño, C. Tondo, D. Livingstone and J. Schnell. 2014. Genetics characterization of the cacao cultivar CCN 51: Its impact and significance on global cacao improvement and production. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 139: 219-224.
- Carr, M.K.V and G. Lockwood. 2011. The water relations and irrigations requeriments of cacao (*Theobroma cacao* L.): a review. *Exp. Agr.* 47:653-676.
- Chaves, M, M. Costa, O. Zarrock, C. Pinheiro, C. Lopes and J. S. Pereira. 2016. Controlling stomatal aperture in semiarid regions: the dilemma of saving water or being cool. *Plant Sci.* 251: 54-64.
- Donat, MG, L.V. Alexander, H. Yang, I. Durre, R. Vose, R.J.H. Dunn, KM. Willett, E. Aguilar, M. Brunet, J. Caesar, B. Hewitson, C. Jack, A. M. Klein-Tank, A.C. Kruger, J.A Marengo, T.C. Peterson, M. Renom, C. Oria-Rojas, M. Rusticucci, J. Salinger, A. Sanhouri-Elrayah, S.S. Sekele, A.K. Srivastava, B. Trewin, C. Villarroel, L.A Vincent, P. Zhai, X. Zhang and S. Kitching. 2013. Updated analyses of temperature and precipitation extreme indices since the beginning of the twentieth century: The HadEX2 dataset. *J. of Geoph. Res.: Atmospheres* 118:2098-2118.
- Gambetta, G, T. Knipfer, W. Fricke and A.J. Mc Elrone. 2017. Aquaporins and Root Water Uptake, 133-153. *In: Chaumont, F. and S.D. Tyerman (Eds), Plant Aquaporins: From transport to signaling.* Springer DOI 10.1007/978-3-319-49395-4\_6.
- Garcia, J. and L. Moreno. 2015. Respuestas fisiológicas de *Theobroma cacao* L. en etapa de vivero a la disponibilidad de agua en el suelo. *Acta Agronómica.* 65 (1):44-50.
- Goncalves, B, J. Moutinho-Pereira, A. Santos, A. Silva, E. Bacelar, C. Correia and E. Rosa. 2006. Scion-rootstock interaction affects the physiology and fruit quality of sweet cherry. *Tree Phys.* 26: 93-104.
- Goenaga, R., S. Guiltinan and H. Seguíne. 2015. Yield performance and bean quality traits of cacao propagated by grafting and somatic embryo-derived cutting. *Hort. Science.* 50 (3): 358-362.
- Irizarry, H. and R. Goenaga. 2000. Clonal selection in cacao based on early yield performance of grafted trees. *J. Agr. U. Puerto Rico.* 84, 153-163.
- Jaimez, R, F. Amores, A. Vasco, R.G. Loor, O. Tarqui, G. Quijano, J. Jimenez and W. Tezara. 2018. Photosynthetic response to low and high light of *Theobroma cacao* L. growing without shade in an area of low evaporative demand. *Acta Biol. Colomb.* 23 (1):95-103.
- Jaimez, R., D. Vera, A. Mora, R.G. Loor and B. Bailey. 2020. A disease and production index (DPI) for selection of Cacao (*Theobroma cacao* L.) clones highly productive and tolerant to pod rot diseases. *Plant Pathology.*
- Keller, M., L.J. Mills and J.F. Harbertson. 2012. Rootstock effects on deficit-irrigated wine grapes in a dry climate: vigour, yield formation, and fruit ripening. *Amer. J. Enology Viticulture.* 2012; 63: 29-39.
- Leonardi, C. and F. Giuffrida. 2006. Variation of Plant Growth and Macronutrient Uptake in Grafted Tomatoes and Eggplants on Three Different Rootstocks. *Eur. J. Hort. Sci.* 71 (3): 97-101.
- Loor, R., F. Amores, S. Vasco, J. Quiroz, T. Casanova, A. Garzón, I. Sotomayor-Cantos, J. Jiménez, O. Tarqui, G. Rodríguez, G. Quijano, L. Plaza, H. Guerrero and F. Zambrano. 2019. INIAP-EETP-800 'Aroma Pichilingue', nueva variedad ecuatoriana de cacao fino de alto rendimiento. *Rev. Fitotecnia Mex.* 42 (2): 187 - 189.
- Martínez-Ballesta, C., C. Alcaraz-López, B. Muries, C. Mota-Cadenas and M. Carvajal. 2010. Physiological aspects of rootstock-scion interactions. *Sci. hortic.* 127: 112-118.
- Motamayor J.C., P. Lachenaud, J.W. da Silva e Mota, R. Loor, D.N. Kuhn, J.S. Brown and R. Schnell. 2008.

- Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L). PLoS ONE 3(10): e3311. Available in: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>
- Orchard, J. E. 1985. The effect of the dry season on the water status of *T. cacao* in Ecuador. In Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Cacao Research Conference, Lomé, Togo, February 1984, p: 103–109.
- Pantin, F, F. Monnet, D. Jannaud, J.M. Costa, J. Renaud, B. Muller, T. Simonneau and B. Genty. 2012. The dual effect of abscisic acid on stomata. New. phytol. 197: 65-72.
- Pautasso, M., T. Doring, M. Garbelotto, L. Pellis and M. Jeger. 2012. Impacts of climate change on plant diseases-opinions and trends. Eur. J. Plant Pathol. 133: 295-313.
- Santos, I., A.A. De Almeida, T.D Anher, A. Da Conceição, C. Pirovani, J. Pires, R. Valle and V. Baligar. 2014. Molecular, physiological and biochemical responses of *Theobroma cacao* L genotypes to soil water deficit, Plos One 9 (12): e115746. DOI:10.1371/Journal.pone.0115746.
- Sharma, R. M., A.K. Dubey, O.P. Awasthi and K. Charanjeet. 2016. Growth, yield, fruit quality and leaf nutrient status of grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.): Variation from rootstocks. Sci. hortic. 210: 41-48.
- Ribeiro, M., A.A. Almeida, T. Alves, K. Gramacho, C. Pirovani and R. Valle. 2016. Rootstock x scion interations on *Theobroma cacao* resistance to witches broom: photosynthetic, nutritional and antioxidant metabolism responses. Acta Physiol. Plant. 38:73. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2095-9>.
- Tramontini, S, M. Vitali, L. Centioni, A. Schubert and C. Lovisolo. 2013. Rootstock control of scion response to water stress in grapevine. Environ. Exp. Bot. 93: 20–26.
- Yin, J.P.T. 2004. Rootstock effects on cocoa in Sabah, Malaysia. Exp. Agr. 40: 445–452.
- Warschefsky, E, L. Klein, M. Frank, D. Chitwood, J. London, E. Wettberg and A. Miller. 2016. Rootstock: Diversity, domestication and impact on shot phenotypes. Trends. Plant Sci. 21: 418-437.







## Nota técnica / Technical note

# Diversidad y distribución de nematodos fitoparásitos en campos de golf en localidades de Baja California Sur, México

Diversity and distribution of plant parasitic-nematodes on golf courses in localities of Baja California Sur, Mexico

Diversidade e distribuição de nematóides fitoparasitários em campos de golfe em localidades de Baja California Sur, México

Omar Jorge Sánchez-Arce<sup>1</sup>, Alejandro Palacios-Espinosa<sup>1</sup>, José Armando Carillo-Fasio<sup>2</sup>, Luis Guillermo Hernández-Montiel<sup>3</sup>, José Saúl Hernández-Rubio<sup>1</sup> y Mirella Romero-Bastidas<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento Académico de Agronomía, Universidad Autónoma de Baja California Sur. Carretera al sur km 5,5, Col. El Mezquitito. 23080, La Paz, Baja California Sur. México. Correo electrónico: (OS) [omarjorge.fm@gmail.com](mailto:omarjorge.fm@gmail.com), ; (AP) [palacios@uabcs.mx](mailto:palacios@uabcs.mx) ; (JH) [saulhr@gmail.com](mailto:saulhr@gmail.com), ; (MR) [miromero@uabcs.mx](mailto:miromero@uabcs.mx) . <sup>2</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC. Carretera Culiacán-Eldorado km 5.5, Culiacán, Sinaloa. Correo electrónico: [acarrillo@uabcs.mx](mailto:acarrillo@uabcs.mx) . <sup>3</sup>Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Calle Instituto Politécnico Nacional 195. Col. Playa Palo de Santa Rita Sur. La Paz, Baja California Sur, México. Correo electrónico: [lhernandez@cibnor.mx](mailto:lhernandez@cibnor.mx) .

## Resumen

El golf es un atractivo turístico en Baja California Sur (BCS), México. Sin embargo, la calidad de sus campos se demerita al presentar amarillamiento y muerte en césped. Los nematodos fitoparásitos son una de las principales limitantes alrededor del mundo. Sin embargo, en BCS, se desconoce su presencia. Con la finalidad de determinar la diversidad y distribución de fitonematodos en campos de golf en BCS, se colectaron muestras de suelo en cuatro campos. La extracción de nematodos fue mediante la técnica de embudo de Baerman. Los especímenes se

Recibido el 07-10-2020 • Aceptado el 29-01-2021

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [miromero@uabcs.mx](mailto:miromero@uabcs.mx)

fijaron para la identificación de género y se cuantificó la población en cada zona. Se encontraron los géneros: *Meloidogyne*, *Helicotylenchus*, *Criconema*, *Xiphinema*, *Pratylenchus*, *Tylenchus*, *Hoplolaimus* y *Trichodorus* asociados a la muerte de césped con variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) en poblaciones. Estos resultados son los primeros registros de estos géneros en los campos de golf evaluados, útiles para el desarrollo de estrategias de control en el Estado.

**Palabras clave:** *Meloidogyne*, *Hoplolaimus*, *Helicotylenchus*, *Cynodon dactylon*, césped bermuda, identificación.

### Abstract

Golf is a tourist attraction in Baja California Sur (BCS), Mexico. However, the quality of its fields is detracted by presenting yellowing and death on turfgrass. Plant parasitic nematodes are one of the main limitations around the world. However, in BCS, its presence is unknown. In order to determine the diversity and distribution of phytonmatodes in golf courses in BCS, soil samples were collected in four courses. Nematode extraction was done using the Baerman funnel technique. Specimens were identified at the genus level and the population in each zone was quantified. The genera *Meloidogyne*, *Helicotylenchus*, *Criconema*, *Xiphinema*, *Pratylenchus*, *Tylenchus*, *Hoplolaimus* and *Trichodorus* were associated with the death of turfgrass with significant variations ( $p < 0.05$ ) in populations. These results are the first records of these genera in the golf courses evaluated, useful in the development of in the State.

**Keywords:** *Meloidogyne*, *Hoplolaimus*, *Helicotylenchus*, *Cynodon dactylon*, bermuda turfgrass, identification.

### Resumo

O golfe é uma atração turística na Baja California Sur (BCS), no México. No entanto, a qualidade de seus campos é prejudicada por apresentar amarelecimento e morte na grama. Os nematóides parasitas de plantas são uma das principais limitações em todo o mundo. No entanto, em BCS, sua presença é desconhecida. A fim de determinar a diversidade e distribuição de fitonmátodos em campos de golfe no BCS, amostras de solo foram coletadas em quatro campos. A extração de nematóides foi feita por meio da técnica de funil de Baerman. Os espécimes foram identificados em nível de gênero e a população em cada zona foi quantificada. Os gêneros *Meloidogyne*, *Helicotylenchus*, *Criconema*, *Xiphinema*, *Pratylenchus*, *Tylenchus*, *Hoplolaimus* e *Trichodorus* foram associados à morte de gramíneas com variações significativas ( $p < 0,05$ ) nas populações. Esses resultados são os primeiros registros desses gêneros nos campos de golfe avaliados, úteis no desenvolvimento de estratégias de controle no Estado.

Palavras-chave: *Meloidogyne*, *Hoplolaimus*, *Helicotylenchus*, *Cynodon dactylon*, grama bermuda, identificação.

## Introducción

El golf es un deporte que genera inversión, turismo y economía en el ámbito mundial. México es uno de los principales países de la industria del golf con 200 campos, distribuidos en 31 estados de la República mexicana, con una ganancia cercana a 419 millones de dólares (SECTUR, 2019). En los campos de golf la calidad del césped es importante en el desarrollo de este deporte. Los nematodos fitoparásitos son una limitante que afecta significativamente la calidad y sanidad del césped en los campos de golf (Bojang *et al.*, 2019). Estos fitoparásitos atroflan el sistema radical y originan clorosis al follaje, ocasionando daños alrededor del mundo por 80 mil millones de **dólares** al año (Zeng *et al.*, 2017). Los principales nematodos que se asocian al césped son *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Anguina*, *Criconemella*, *Helicotylenchus*, *Trichodorus*, *Hoplolaimus*, *Belonolaimus*, entre otros (Crow y Luc, 2014). La incidencia de éstos géneros en césped ha sido reportada en Estados Unidos (Allan-Perkins *et al.*, 2017), Sudáfrica (Swart *et al.*, 2000), Argentina (Chaves y Torres, 2000), entre otros. En México son escasos los estudios sobre la identificación y daño ocasionado al césped de los campos de golf debido a nematodos fitoparásitos (García-Munguía *et al.*, 2017). Sus síntomas generalmente son confundidos con los ocasionados por hongos fitopatógenos (Wheeler *et al.*, 2019). Por lo tanto, realizar estudios sobre población, mapas de distribución y diagnóstico morfológico

## Introduction

Golf is a sport that generates investment, tourism and economy worldwide. Mexico is one of the main countries of the golf industry with 200 courses, distributed in 31 states of the Mexican Republic, with a profit close to 419 millions of dollars (SECTUR, 2019). On the golf courses, the quality of the grass is important in the development of this sport. Plant-parasitic nematodes are a limitation that significantly affects the quality and health of the grass in golf courses (Bojang *et al.*, 2019). These phytoparasites stunt the root system and cause chlorosis to the foliage, causing damages around the world of 80 billion dollars per year (Zeng *et al.*, 2017). The main nematodes that are associated to the grass are *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Anguina*, *Criconemella*, *Helicotylenchus*, *Trichodorus*, *Hoplolaimus*, *Belonolaimus*, among others (Crow and Luc, 2014). The incidence of these genera has been reported in United States (Allan-Perkins *et al.*, 2017), South Africa (Swart *et al.*, 2000), Argentina (Chaves and Torres, 2000), among others. In Mexico, studies about the identification and damage caused to the grass of golf courses due to phytoparasitic nematodes, are scarce (García-Munguía *et al.*, 2017). Their symptoms are usually confused with those caused by plant pathogenic fungi (Wheeler *et al.*, 2019). Therefore, realize population studies, distribution maps and morphological diagnosis of phytoparasitic nematodes are the starting point to develop effective control programs that help to minimize

de los nematodos fitoparásitos, constituyen el punto de partida para desarrollar programas efectivos de control que ayuden a minimizar la aplicación de agroquímicos, así como la contaminación ambiental y la eliminación de fauna y flora benéfica del suelo (Steilmann *et al.*, 2019). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar la diversidad y distribución de nematodos fitoparásitos asociados a césped de campos de golf, municipios Los Cabos y La Paz, estado Baja California Sur, México.

## Materiales y métodos

Sitio de muestreo e identificación de nematodos fitoparásitos: La investigación se realizó en febrero de 2019, en el municipio de Los Cabos (22°52'52"N-109°54'49"O) y La Paz (24°08'32"N 110°18'39"O), pertenecientes al estado de Baja California Sur, México. Los nematodos se obtuvieron a partir de muestras de suelo en cuatro campos de golf (Z1, Z2, Z3 y Z4), cultivados con césped bermuda (*Cynodon dactylon* L.) representando 22% de los campos en el Estado. En cada campo, se tomaron 10 muestras (N=40) de suelo en áreas de césped con síntomas de amarillamiento a 20 cm de profundidad, muestreados en un patrón de zig-zag (Zeng *et al.*, 2012a). Las muestras se depositaron en bolsas de polietileno (4 kg) y se trasladaron al laboratorio de Fitopatología de la Universidad Autónoma de Baja California Sur y 24 h después fueron procesadas. Los nematodos se extrajeron de 100 cm<sup>3</sup> de

the application of agrochemicals, as well as environmental contamination and the elimination of beneficial soil flora and fauna (Steilmann *et al.*, 2019). Therefore, the objective of the present study was to determine the diversity and distribution of phytoparasitic nematodes associated with golf course grass, Los Cabos and La Paz municipalities, Baja California Sur state, Mexico.

## Materials and methods

Sampling place and identification of plant-parasitic nematodes: The research was conducted in February 2019, in Los Cabos (22°52'52" N-109°54'49" O) and La Paz (24°08'32"N 110°18'39"O) municipalities, belonging to the state of Baja California Sur, Mexico. The nematodes were obtained from soil samples in four golf courses (Z1, Z2, Z3 and Z4), cultivated with Bermuda grass (*Cynodon dactylon* L.) representing the 22% of the courses in the State. In each course, 10 samples were taken (N=40) from the soil in areas of grass with yellowing symptoms at 20 cm depth, sampled in a zig-zag pattern (Zeng *et al.*, 2012a). The samples were placed in polyethylene bags (4 kg) and were transferred to the Phytopathology laboratory of the Autonomous University of Baja California Sur and 24 h later were processed. Nematodes were extracted from 100 cm<sup>3</sup> of soil, using the Baermann funnel technique (Baermann, 1917). After 48 h, the nematodes recovered, were observed and quantified under the

suelo, mediante la técnica de embudo de Baermann (Baermann, 1917). 48 h después, los nematodos recuperados se observaron y cuantificaron bajo microscopio óptico (Labomed CxL), siguiendo el procedimiento de Fleming *et al.* (2016). La identificación se realizó a nivel de género, determinando las principales características morfológicas tales como: forma del cuerpo, presencia y forma del estilete, forma de la cola y posición de la vulva (Siddiqi, 2000; Zeng *et al.*, 2012b). La distribución de los géneros en las zonas evaluadas se registró al georeferenciar cada punto de muestreo.

Densidad poblacional y frecuencia de ocurrencia de nematodos en suelo: La frecuencia de ocurrencia se obtuvo con el número de campos infestados con un género entre el número de campos evaluados expresado en porcentaje (%) (Zeng *et al.*, 2012a). El número total de nematodos fitoparásitos por muestra, se determinó al cuantificar las poblaciones de nematodos, bajo una placa de recuento y tomar una media de 5 recuentos en cada caso. Los datos se expresaron como el número de nematodos en 100 cm<sup>3</sup> de suelo (Zeng *et al.*, 2012a) y se analizaron mediante la prueba de comparación de medias con Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando el programa SAS 10,0 para Windows<sup>®</sup> (SAS<sup>®</sup> Inc., 2011).

## Resultados y discusión

Identificación y distribución de nematodos: Se identificaron ocho géneros en los cuatro campos de golf muestreados (figura 1), correspondientes

optical microscope (Labomed CxL), following the procedure by Fleming *et al.* (2016). The identification was realized at genus level, determining the main morphological characteristics such as: body shape, presence and shape of the stipe, shape of the tail and position of the vulva (Siddiqi, 2000; Zeng *et al.*, 2012b). The distribution of genera in the evaluated areas was recorded by geo-referencing each sampling point.

Population density and nematodes frequency occurrence in soil: The frequency occurrence was obtained with the number of infected courses with a genus between the numbers of courses evaluated expressed in percentage (%) (Zeng *et al.*, 2012a). The total number of plant-parasitic nematodes per sample was determined by quantifying the nematode populations under a counting plate and taking an average of 5 counts in each case. Data were expressed as the number of nematodes in 100 cm<sup>3</sup> of soil (Zeng *et al.*, 2012a) and were analyzed by Tukey's mean comparison test ( $p < 0.05$ ), using SAS 10.0 for Windows<sup>®</sup> (SAS<sup>®</sup> Inc., 2011).

## Results and discussion

Identification and distribution of nematodes: Eight genera were identified on four golf courses sampled (figure 1), corresponding to *Meloidogyne*, *Helicotylenchus*, *Criconema*, *Xiphinema*, *Pratylenchus*, *Tylenchus*, *Hoplolaimus* and *Trichodorus*. Crow and Luc (2014), pointed out that these genera represent to the key phytoparasites



a *Meloidogyne*, *Helicotylenchus*, *Criconeema*, *Xiphinema*, *Pratylenchus*, *Tylenchus*, *Hoplolaimus* y *Trichodorus*. Crow y Luc (2014), señalaron que éstos géneros representan a los fitoparásitos clave de césped y se han reportado en Estados Unidos (Jagdale *et al.*, 2020), Korea (Mwamula *et al.*, 2020), Nigeria (Nzeako *et al.*, 2016), Brasil (Azevedo de Oliveira *et al.*, 2018) y Malasia (Bojang *et al.*, 2019). Para México, este es el primer reporte sobre fitonematodos asociados a césped bermuda en campos de golf. La distribución de los nematodos se concentró significativamente en la zona 3 y 4, siendo *Meloidogyne* y *Hoplolaimus* los de mayor distribución. Estos resultados coinciden con los reportados por McClure y Schmitt (2013), quienes señalaron a *Hoplolaimus* y *Meloidogyne* como fitoparásitos primarios de césped en el Este y Sur de Estados Unidos. Así mismo, Fleming *et al.* (2016), registraron a *Meloidogyne* como el de mayor distribución en pastos y cereales en Irlanda del Norte.

Densidad poblacional y frecuencia de ocurrencia: La población y ocurrencia de nematodos varió significativamente ( $p < 0,05$ ) entre las zonas muestreadas (cuadro 1). *Meloidogyne* registró mayor población y ocurrencia en la zona 4 y 3, seguido de la zona 2, en comparación con la zona 1. *Hoplolaimus* registró mayor población y ocurrencia en la zona 3 y 4, y difirió estadísticamente ( $p < 0,05$ ) de las zonas 1 y 2. La ocurrencia y población de *Helicotylenchus* presentaron diferencias significativas entre las cuatro zonas. *Criconeema*, solo presentó población en la zona 1. Así mismo, las poblaciones de *Pratylenchus* y *Trichodorus* fueron

de grass, and they have been reported in United States (Jagdale *et al.*, 2020), Korea (Mwamula *et al.*, 2020), Nigeria (Nzeako *et al.*, 2016), Brazil (Azevedo of Oliveira *et al.*, 2018) and Malaysia (Bojang *et al.*, 2019). For Mexico, this is the first report about phytonematodes associated with Bermuda grass on golf courses. The nematodes distribution was significantly concentrated in areas 3 and 4, being *Meloidogyne* and *Hoplolaimus* the most widely distributed. These results coincide with those reported by McClure and Schmitt (2013), who reported *Hoplolaimus* and *Meloidogyne* as primary phytoparasites of grass in the eastern and southern of United States. Likewise, Fleming *et al.* (2016) recorded *Meloidogyne* as the most widely distributed on grasses and cereals in Northern Ireland.

Population density and occurrence frequency: The population and the occurrence of nematodes varied significantly ( $p < 0.05$ ) between the areas sampled (Table 1). *Meloidogyne* recorded higher population and occurrence in the area 4 and 3, followed by the area 2, compared to the area 1. *Hoplolaimus* recorded higher population and occurrence in the area 3 and 4, and it differed statistically ( $p < 0, 05$ ) of the areas 1 and 2. The occurrence and population of *Helicotylenchus* presented significant differences between the four areas. *Criconeema*, only presented population in the area 1. In the same way, the populations of *Pratylenchus* and *Trichodorus* were lower and were only identified

menores y solo se identificaron en la zona 4. *Xiphinema* registró poblaciones en las zonas 1 y 4, con diferencias significativas entre ellas. Así como *Tylenchus* en las zonas 2 y 4. Se ha establecido que el impacto de los nematodos en la planta es proporcional a su población en el suelo. Así mismo, Palomares-Ruiz *et al.* (2018), señalaron que poblaciones comúnmente bajas de nematodos se consideran parásitos de segunda clase, al causar *síntomas visuales* solo con poblaciones altas. Esta capacidad de causar daño se ve favorecida principalmente por factores edafoclimáticos y agronómicos como el monocultivo, las altas precipitaciones y los suelos arenosos (Janati *et al.* 2018).

in the area 4. *Xiphinema* recorded populations in the areas 1 and 4, with significant differences among them, as well as *Tylenchus* in the areas 2 and 4. It has been established that the nematodes impact on the plant is proportional to its population in the soil. Likewise, Palomares-Ruiz *et al.* (2018), pointed out that commonly low populations of nematodes are considered second-class parasites, by causing visual symptoms only with high populations. This ability to cause damage is mainly favored by edaphoclimatic and agronomic factors such as monoculture, high rainfall and sandy soils (Janati *et al.* 2018).

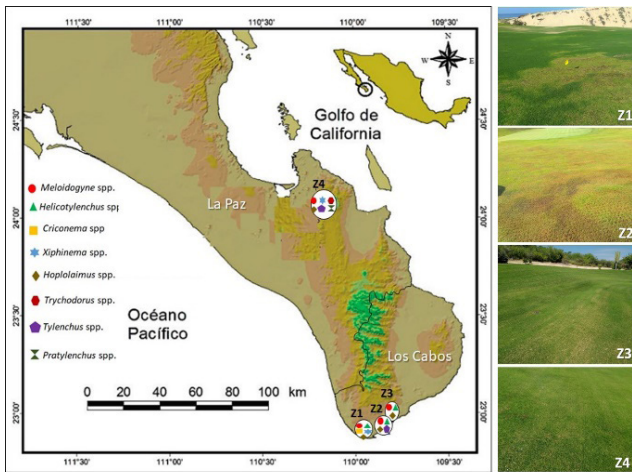


Figura 1. Mapa de distribución de los géneros de nematodos en césped (*Cynodon dactylon*), de campos de golf, municipios Los Cabos (Zona 1, 2, 3) y La Paz (Zona 4), Baja California Sur, México.

Figure 1. Distribution map of nematode genera in grass (*Cynodon dactylon*), of golf courses, Los Cabos (Zone 1, 2, 3) and La Paz (Zone 4) municipalities, Baja California Sur, Mexico.

**Cuadro 1. Frecuencia de ocurrencia y población de fitonematodos en suelo de campos de golf, municipios Los Cabos (Z1, Z2, Z3) y La Paz (Z4), en Baja California Sur, México.**

**Table 1. Occurrence frequency and populations of phytonematodes in golf course soils, Los Cabos (Z1, Z2, Z3) and La Paz (Z4) municipalities, in Baja California Sur, Mexico.**

Géneros	Zona 1		Zona 2		Zona 3		Zona 4	
	FO	DP	FO	DP	FO	DP	FO	DP
<i>Meloidogyne</i>	60a	87d	70a	696c	100a	1,102b	100a	1,843a
<i>Hoplotaimus</i>	50a	12b	10b	0,8b	70b	76a	80ab	61,2a
<i>Helicotylenchus</i>	40ab	2,8b	30ab	33,6a	100a	27,2a	0	0b
<i>Criconema</i>	40ab	2,4a	0	0b	0	0b	0	0b
<i>Xiphinema</i>	10b	1,2b	0	0b	0	0b	50bc	20a
<i>Pratylenchus</i>	0	0b	0	0b	0	0b	20c	24,4a
<i>Trichodorus</i>	0	0b	0	0b	0	0b	90a	83,6a
<i>Tylenchus</i>	0	0b	10b	0,8b	0	0b	20c	28a

FO=Frecuencia de ocurrencia (%), DP=Densidad poblacional (nematodos/100 cm<sup>3</sup> de suelo). Columnas con letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey (p<0,05).

FO= Occurrence frequency (%), DP= Population density (nematodes/100 cm<sup>3</sup> of soil). Columns with different letters indicate significant differences according to Tukey's test (p<0.05).

## Conclusión

Este es el primer registro de diversidad y distribución de géneros de nematodos fitoparásitos asociados a césped en campos de golf en Los Cabos y La Paz, BCS, México. Se sugiere continuar el estudio de diversidad de especies en otros campos de golf de la región, estimar el nivel de daño y el análisis costo-beneficio en prácticas de manejo.

## Conclusion

This is the first record about diversity and distribution of phytoparasitic nematodes genera associated to grass on golf courses in Los Cabos and La Paz, BCS, Mexico. It is recommendable to continue the study of species diversity in other golf courses in the region, to estimate the level of damage and the cost-benefit analysis in management practices.

## Literatura citada

Allan-Perkins, E., D. Manter, R. Wick, S. Ebdon and G. Jung. 2017. Nematode communities on putting greens, fairways, and roughs of organic and conventional cool-season golf courses. Appl. Soil Ecol. 121: 161-171.

## *End of English Version*

Azevedo de Oliveira, S., C. Oliveira, C. Maleita, M. Silva, I. Abrantes and S. Wilcken. 2018. First report of *Meloidogyne graminis* on golf courses turfgrass in Brazil. Plos One. 13(2): 1-14.

- Baermann, G. 1917. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. NTvG. 57: 131-137.
- Bojang, S., I. Abd Ghani, J. Kadir, A. Paiko S., Y. Iftikhar, and M. Kamran. 2019. Ultrastructural characterization of *Meloidogyne graminis* from golf course turf grasses in Peninsular Malaysia. Pak. J. Zool. 51(4): 1591.
- Chaves, E. y M. Torres. 2000. Nematofauna asociada a campos de golf en el sudeste de la provincia de Buenos Aires. Revista Fac. Agron. 20(3): 379-386.
- Crow, W. and J. Luc. 2014. Field efficacy of furfural as a nematicide on turf. J. Nematol. 46 (1): 8-11.
- Fleming, T., N. McGowana, A. Maulea and C. Fleming. 2016. Prevalence and diversity of plant parasitic nematodes in Northern Ireland grassland and cereals, and the influence of soils and rainfall. Plant Path. 65: 1539-1550.
- García-Munguía, C., M. Acosta-Ramos, O. Vázquez-Martínez, M. Pérez-Sato, A. García-Munguía, O. García-Munguía and A. García-Munguía. 2017. Morphological, molecular and pathogenic diagnostic of fungi in lawn's root and neck in Mexico. Phytom. 86: 258-264.
- Jagdale, G., E. Ali, S. Waliullah, A. Hajihassani, K. Martin and A. Martínez-Espinoza. 2020. First Report of the Spiral Nematode *Helicotylenchus microlobus* infecting *Paspalum vaginatum*, seashore paspalum turfgrass in Georgia, USA. Plant Dis. 104(10):1-3.
- Janati, S., A. Houari, A. Wifaya, A. Essarioui, A. Mimouni, A. Hormatallah, M. Sbaghi, A. A. Dababat y F. Mokrini. 2018. Occurrence of the root-knot nematode species in vegetable crops in Souss region of Morocco. Plant Pathol. J. 34(4): 308-315.
- McClure, M. A. and M. E. Schmitt. 2013. Root-knot nematodes parasitizing turfgrass in the Western United States. The University of Arizona, Tucson. Pp. 1-6.
- Mwamula, A., H. Na, Y. Kim, G. Han and D. Lee. 2020. Characterization of a new spiral nematode, *Helicotylenchus asiaticus* n. sp., and three known species from Korea; with comments on the validity of *Helicotylenchus microlobus* Perry in Perry, Darling & Thorne, 1959. Eur. J. Plant Pathol. 157: 565-581.
- Nzeako, S., H. Imafidor, E. Ogwumba and C. Ezenwaka. 2016. Vertical distribution of the lesion nematodes: *Pratylenchus* species in selected Turf fields in Rivers State, Nigeria. J. Agric. Vet. Sci. 9(7): 53-58.
- Palomares-Ruiz, J. E., C. Cantalapedra-Navarrete, A. Archidona-Yuste, N. Vovlas, E. A. Tzortzakakis and P. Castillo. 2018. Molecular and morphological characterization of the spiral nematode *Helicotylenchus oleae* Inserra, Vovlas & Golden, 1979 (Nematoda: Hoplolaimidae) in the Mediterranean Basin. Eur J Plant Pathol. 150: 881-891.
- SAS® Inc. 2011. SAS Statistical Analysis System. User's guide; Statistics 10.0. ed. Cary.
- SECTUR. Secretaría de Turismo (México). 2019. Resultados de la actividad turística 2019. Disponible en: [https://www.datatur.sectur.gob.mx/RAT/RAT-2019-06\(ES\).pdf](https://www.datatur.sectur.gob.mx/RAT/RAT-2019-06(ES).pdf). Fecha de consulta: 05/04/2019.
- Siddiqi, M. 2000. Tylenchida-parasites of plants and insects. CABI Bioscience, Egham, UK, 848.
- Steilmann, P., N. Denardin, M. Raab, A. Menezes and A. Destefano. 2019. Detection and quantification of phytopathogenic bacteria in wheat seed. Nativa: Rev. Acad. Cienc. Agrár. Ambient. 7(4): 349-355.
- Swart, A., M. Marais and A. Schoeman. 2000. Plant nematodes in South Africa. 2: golf-course putting greens. Afr. Plant Prot. 6(1): 35-39.
- Wheeler, D., J. Scott, J. Dung and D. Johnson. 2019. Evidence of a trans-kingdom plant disease complex between a fungus and plant-parasitic nematodes. Plos One. 14(2): 1-16.

Zeng, J., Z. Zhang, M. Li, X. Wu, Y. Zeng and Y. Li. 2017. Distribution and molecular identification of *Meloidogyne* spp. parasiting flue-cured Tobacco in Yunnan, China. *Plant Protect. Sci.* 54:183-189.

Zeng, Y., W. Ye, L. Tredway, S. Martin and M. Martin. 2012b. Taxonomy and morphology of plant-parasitic nematodes associated with turfgrasses in North and South Carolina, USA. *Zootaxa.* 3452: 1-46.

Zeng Y., W. Ye, S. Martin, M. Martin and L. Tredway. 2012a. Diversity and occurrence of plant-parasitic nematodes associated with golf course turfgrasses in North and south Carolina, USA. *J. Nematol.* 44(4): 337-347.

# Dinámica de la vegetación y variabilidad pluviométrica en la cuenca del río Portoviejo

Vegetation dynamics and climate variability in the Portoviejo river basin

Dinâmica da vegetação e variabilidade climática na bacia do rio Portoviejo

Karol K. Cuenca Zambrano<sup>1\*</sup> y Henry A. Pacheco Gil<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudiante de la Maestría en Ingeniería Agrícola, Instituto de Postgrado, Universidad Técnica de Manabí. Correo electrónico: karolkkcz@gmail.com, . <sup>2</sup>Facultad de Ingeniería Agrícola de la Universidad Técnica de Manabí. Correo electrónico: henrypacheco@gmail.com, .

## Resumen

El cambio climático actualmente es un problema a nivel mundial, ya que incide de forma significativa en la dinámica de la vegetación. El objetivo de esta investigación es analizar la influencia de la variabilidad climática en la dinámica de la vegetación en la cuenca del río Portoviejo. La metodología consistió en el cálculo del NDVI con el uso de imágenes multiespectrales del satélite Landsat y el análisis de los registros pluviométricos. Las imágenes se descargaron de la plataforma geoespacial EarthExplorer con una resolución espacial de 30 m, se seleccionaron imágenes del período 1998-2019 para analizar su tendencia temporal. Se usaron los registros pluviométricos históricos de la estación Portoviejo, del Instituto Nacional de Hidrología y Meteorología. Los resultados mostraron que la vegetación experimentó una tendencia de reverdecimiento discontinua, influenciada por la variabilidad de las precipitaciones. Se encontró una tendencia homogénea en la distribución espacial del NDVI, con densa y muy densa cobertura vegetal en la parte alta de la cuenca, así como escasa y nula cobertura en la parte baja. El área de mayor cobertura le correspondió a la vegetación densa con un porcentaje superior al 30%.

**Palabras clave:** Landsat, cambio climático, Cobertura de los suelos, SIG.

---

Recibido el 18-11-2020 • Aceptado el 21-12-2020

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [kcuenca3767@utm.edu.ec](mailto:kcuenca3767@utm.edu.ec)

### Abstract

Climate change is currently a global problem, as it significantly affects the dynamics of vegetation. The objective of this research is to analyze the influence of climate variability on the dynamics of vegetation in the Portoviejo river basin. The methodology consisted in the calculation of the NDVI with the use of multispectral images from the Landsat satellite and the analysis of the fluviometric records. The images were downloaded from the Earth Explorer geospatial platform with a spatial resolution of 30 m, images from the period 1998-2019 were selected to analyze their temporal trend. The historical fluviometric records of the Portoviejo station, of the National Institute of Hydrology and Meteorology were used. The results showed that the vegetation experienced a discontinuous greening trend, influenced by the variability of rainfall. A homogeneous trend was found in the spatial distribution of the NDVI, with dense and very dense vegetation cover in the upper part of the basin, as well as little or no cover in the lower part. The area with the greatest coverage corresponded to dense vegetation with a percentage higher than 30%.

**Keywords:** Landsat, climate change, Land cover, GIS.

### Resumo

A mudança climática é atualmente um problema global, pois afeta negativamente a dinâmica da vegetação. O objetivo desta pesquisa é analisar a influência da variabilidade climática na dinâmica da vegetação na bacia do rio Portoviejo. A metodologia consistiu no cálculo do NDVI com o uso de imagens multiespectrais do satélite Landsat e na análise dos registros pluviométricos. As imagens foram baixadas da plataforma geoespacial EarthExplorer com resolução de 30 m, as imagens foram selecionadas no período de 1998 a 2019 para analisar sua tendência temporal. Foram utilizados os registros pluviométricos históricos da estação Portoviejo, do Instituto Nacional de Hidrologia e Meteorologia. Os resultados mostraram que a vegetação experimentou uma tendência de esverdeamento descontínuo, influenciado pela variabilidade das chuvas. Foi encontrada uma tendência homogênea na distribuição espacial do NDVI, com cobertura vegetal densa e muito densa na parte superior da bacia, bem como pouca ou nenhuma cobertura na parte inferior. A área de maior cobertura correspondeu a vegetação densa com percentual superior al 30%.

**Palavras-chave:** Landsat, mudanças climáticas, cobertura do piso, GIS.



## Introducción

El cambio climático es un fenómeno global, su dinámica y escala han superado los aspectos ecológicos, donde la energía de combustión fósil, actividades industriales, cambios de uso de suelo, deforestación y la degradación de vegetación son fuentes de gases de efecto invernadero (Quintana, 2017). A nivel mundial los agricultores están amenazados por el aumento de las temperaturas y cambios patronales de lluvia y se plantean estrategias para mitigar los daños, mediante el uso de prácticas de adaptación de ecosistemas, conservación de suelos y biodiversidad (Cadena *et al.*, 2019). Las actividades humanas y los fenómenos climáticos en Latinoamérica son elementos determinantes de la variabilidad de la vegetación (Millano y Paredes, 2016).

En Ecuador debido a los cambios climáticos, existen aumentos de temperatura en la región litoral y reducciones en la precipitación en el centro norte de la provincia de Manabí (Macías *et al.*, 2019). En la provincia de Chimborazo se determinó que la cobertura vegetal y el uso del suelo están expuestos a cambios climáticos que inciden en la modificación de las precipitaciones y temperaturas y se ve afectada por el ganado y quema de pajonal (Paula *et al.*, 2018). Los patrones de cambio espacial y temporal de la cubierta vegetal cuantifican los efectos de cambio climáticos e impacto humano (Shengzhi *et al.*, 2020). La dinámica de la vegetación muestra que las actividades humanas conducen a la degradación de la vegetación en la

## Introduction

Climate change is a global phenomenon, its dynamics and scale have exceeded ecological aspects, where fossil combustion energy, industrial activities, changes in land use, deforestation and degradation of vegetation are sources of greenhouse gases (Quintana, 2017). At a global level, farmers are threatened by rising temperatures and changes in rainfall patterns and strategies are being proposed to mitigate the damage, using ecosystem adaptation practices, soil conservation and biodiversity (Cadena *et al.*, 2019). Human activities and climatic phenomena in Latin America are determining elements of the variability of the vegetation (Millano and Paredes, 2016).

In Ecuador, due to climatic changes, there are temperature increases in the coastal region and reductions in precipitation in the north-central province of Manabí (Macías *et al.*, 2019). In the province of Chimborazo, it was determined that vegetation cover and land use are exposed to climatic changes that affect the modification of rainfall and temperatures and is affected by livestock and burning of grasslands (Paula *et al.*, 2018). The patterns of spatial and temporal change of the vegetation cover quantify the effects of climatic change and human impact (Shengzhi *et al.*, 2020). Vegetation dynamics shows that human activities lead to degradation of vegetation in the agricultural area (Hongshuai *et al.*, 2019). In this sense, remote sensing is a useful tool for studying

zona agrícola (Hongshuai *et al.*, 2019). En este sentido la teledetección es una herramienta útil para el estudio de la dinámica temporal del cambio climático y su impacto en la vegetación (Zoran *et al.*, 2016).

La evaluación de la productividad primaria, basada en píxeles, se puede utilizar para mejorar las estimaciones y conocer cómo la vegetación cambia con el tiempo y el espacio (Vega y Alvarado, 2019). La dinámica de la biomasa a largo plazo en las tierras secas es de gran importancia para muchas aplicaciones ambientales (Feng *et al.*, 2016).

En numerosas investigaciones, los sensores remotos han permitido realizar análisis del comportamiento promedio temporal o espacial del Índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI, por sus siglas en inglés) y su tendencia (Salinas *et al.*, 2017).

El NDVI es empleado como un indicador de las condiciones de la vegetación para analizar cambios espaciales y temporales (Lijun *et al.*, 2020). El uso de datos espaciales y herramientas de Sistemas de Información Geográfica (GIS, por sus siglas en inglés), determinan la evolución espacio - temporal de sostenibilidad del cambio de la vegetación (Yan-Ling *et al.*, 2020).

El NDVI fue desarrollado matemáticamente para medir la cantidad y el estado de vigorosidad de la vegetación sobre el suelo (Feng *et al.*, 2016). Por lo tanto, el objetivo es analizar la dinámica de la vegetación y sus relaciones con el cambio climático mediante la evaluación del

the temporal dynamics of climate change and its impact on vegetation (Zoran *et al.*, 2016).

The pixel-based assessment of primary productivity can be used to improve estimates and understand how vegetation changes over time and space (Vega and Alvarado, 2019). Long-term biomass dynamics in drylands is of great importance for many environmental applications (Feng *et al.*, 2016).

In numerous investigations, remote sensors have allowed analysis of the average temporal or spatial behavior of the Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) and its trend (Salinas *et al.*, 2017).

The NDVI is used as an indicator of vegetation conditions to analyze spatial and temporal changes (Lijun *et al.*, 2020). The use of spatial data and Geographic Information Systems (GIS) tools determine the spatial-temporal evolution of the sustainability of vegetation change (Yan-Ling *et al.*, 2020).

The NDVI was developed mathematically to measure the amount and vigor state of the vegetation on the ground (Feng *et al.*, 2016). Therefore, the objective is to analyze the dynamics of vegetation and its relationships with climate change by evaluating the NDVI in the Portoviejo river basin and to understand its temporal trend and guarantee the conservation of soil-water resources, flora and fauna.

## Materials and methods

### Characteristics of the study area

The present investigation was carried out in the Portoviejo river

NDVI en la cuenca del río Portoviejo y para entender su tendencia temporal y garantizar la conservación de los recursos suelo-agua, flora y fauna.

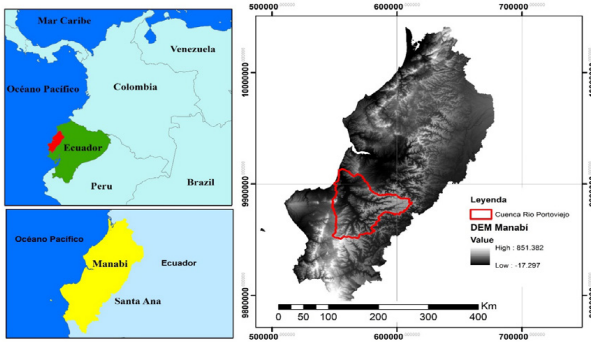
basin with a surface area of 2,133 km<sup>2</sup>. It is in the Coastal region of the Manabí province, between the cantons: Pichincha, Bolívar, Santa Ana, 24 de Mayo, Olmedo, Jipijapa, Portoviejo, Rocafuerte and Sucre, in the central western part of Ecuador (Figure 1).

**Materiales y métodos**

**Características del área de estudio**

La presente investigación se realizó en la cuenca del río Portoviejo con una superficie de 2133 km<sup>2</sup>. Se encuentra ubicada en la región Costa de la provincia de Manabí, entre los cantones: Pichincha, Bolívar, Santa Ana, 24 de Mayo, Olmedo, Jipijapa, Portoviejo, Rocafuerte y Sucre, en la parte centro occidental del Ecuador. (figura 1).

Hydrographically this basin limits to the north with the Chone river basin, to the south with the Jipijapa river, Bravo river and Manta river basins; to the east with the Guayas hydrographic demarcation and to the west with the Pacific Ocean and the Jaramijó and Pajonal river basins. The Portoviejo river basin maintains a dry forest towards the northeast in the middle part, as a consequence of



**Figura 1. Ubicación de la cuenca del río Portoviejo en la provincia de Manabí.**

**Figure 1. Location of the Portoviejo river basin in the province of Manabí.**

Fuente de datos: Eurostat (Oficina Europea de Estadística), para la capa de países del mundo. INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos) para la división político territorial de Ecuador y el IGM (Instituto Geográfico Militar) para el modelo digital de elevaciones.

Data source: Eurostat (European Statistical Office), for the world countries layer. INEC (National Institute of Statistics and Censuses) for the political territorial division of Ecuador and the IGM (Military Geographical Institute) for the digital elevation model

Hidrográficamente esta cuenca limita al norte con la cuenca del río Chone, al sur con las cuencas del río Jipijapa, río Bravo y río Manta; al este con la demarcación hidrográfica del Guayas y al oeste con el océano Pacífico y las cuencas de los ríos Jaramijó y Pajonal. La cuenca del río Portoviejo mantiene un bosque seco hacia el noreste en la parte media, como consecuencia de las condiciones climáticas de pocas precipitaciones y fuertes vientos, por otro lado, en la parte alta de la cuenca predomina un clima húmedo debido a influencia de las zonas montañosas en la condensación y formación de nubes, manteniendo condiciones de humedad que favorece la presencia de vegetación frondosa.

La cuenca presenta una topografía irregular y pendientes pronunciadas, en una buena proporción de su territorio, rodeada de relieves que alcanzan valores de 688,70 m.s.n.m. siendo la pendiente un factor de alto riesgo de pérdida de suelo por erosión hídrica.

### **Procesamiento de imágenes satelitales**

La base de datos se construyó con imágenes de satélites Landsat cubriendo un período de 21 años, desde 1998 hasta 2019. Las imágenes se descargaron de geoportales institucionales de acceso gratuito como EarthExplorer. Para la selección de imágenes disponible en los geoportales se aplicaron filtros de ubicación del área de estudio, cobertura de nube inferior al 30 % y época del año coincidiendo con el periodo de sequía para ubicar imágenes con menor cobertura de nubes (julio- agosto)

the climatic conditions of little rainfall and strong winds, on the other hand, in the upper part of the basin a humid climate predominates due to the influence of the mountainous areas in condensation and cloud formation, maintaining humid conditions that favor the presence of lush vegetation.

The basin has an irregular topography and steep slopes, in a good proportion of its territory, surrounded by reliefs that reach values of 688.70 m.a.s.l. the slope being a high-risk factor for soil loss due to water erosion.

### **Satellite image processing**

The database was built with images from Landsat satellites covering a period of 21 years, from 1998 to 2019. The images were downloaded from free access institutional geoportals such as EarthExplorer. For the selection of images available in the geoportals, filters were applied for the location of the study area, cloud coverage less than 30% and the time of year coinciding with the dry period to locate images with less cloud coverage (July-August).

### **Landsat 7 image banding correction**

Landsat 7 images are characterized by their banding problems, generating gaps that cause approximately the loss of 22% of the information in each image; they are arranged in strips inclined to the left about 8° with respect to the horizontal orientation (Rodríguez *et al.*, 2009). The Landsat Toolbox was downloaded from the United States Geological Survey (USGS) (EROS, 2017). Image correction consisted of eliminating this effect by shifting the partial histograms of the image, to obtain the same average and standard

### Corrección del bandeado de imágenes Landsat 7

Las imágenes de Landsat 7 se caracterizan por sus problemas de bandeado, generando *gaps* que provocan aproximadamente la pérdida de un 22 % de la información de cada imagen; están dispuestos en franjas inclinadas hacia la izquierda unos 8° respecto a la orientación horizontal (Rodríguez *et al.*, 2009). Se descargó la herramienta Landsat Toolbox del Servicio Geológico de los Estados Unidos (USGS). (EROS, 2017). La corrección de imágenes consistió en eliminar este efecto desplazando los histogramas parciales de la imagen, para obtener el mismo promedio y desviación típica (Mas, 2017). Una vez las bandas corregidas, se procedió a realizar el cálculo del Índice de vegetación de diferencia normalizada.

### Cálculo de Índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI)

En todas las imágenes se aplicó la corrección atmosférica para eliminar las interferencias debido a las condiciones atmosféricas y nubosidad (Fua y Burgher, 2015). El NDVI planteado por Rouse *et al.* (1974) se obtuvo mediante el uso de imágenes de los satélites Landsat 7 TM para 1998-2012 y Landsat 8 OLI para 2016-2019.

$$\text{NDVI} = \frac{(\text{NIR} - \text{RED})}{(\text{NIR} + \text{RED})}$$

Donde:

NDVI= Índice de vegetación de diferencia normalizada

NIR= Banda infrarrojo cercano

RED= Banda roja visible

deviation (Mas, 2017). Once the bands were corrected, the calculation of the Normalized Difference Vegetation Index was carried out.

### Calculation of Normalized Difference Vegetation Index (NDVI)

Atmospheric correction was applied to all images to eliminate interferences due to atmospheric conditions and cloudiness (Fua and Burgher, 2015). The NDVI proposed by Rouse *et al.* (1974) was obtained by using images from the Landsat 7 TM satellites for 1998-2012 and Landsat 8 OLI for 2016-2019.

$$\text{NDVI} = \frac{(\text{NIR} - \text{RED})}{(\text{NIR} + \text{RED})}$$

Where:

NDVI = Normalized Difference Vegetation Index

NIR = Near infrared band

RED = Visible red band

The NDVI values (Table 1) for the Portoviejo river basin were grouped using as reference values proposed by Pacheco *et al.* (2020) and Ruiz and Pacheco (2020), in four classes; no vegetation, very sparse vegetation, medium vegetation, dense vegetation and very dense vegetation with their respective ranges. The calculation of the accumulated averages of the largest and smallest area for the period 1998-2019 was performed.

### Fluviometric data processing

The total annual amounts of precipitation were used for the Portoviejo station from the database of the National Institute of Hydrology and Meteorology (INAMHI, 2020), for

Los valores de NDVI (Cuadro 1) para la cuenca del río Portoviejo se agruparon utilizando como valores de referencia propuestos por Pacheco *et al.* (2020) y Ruiz y Pacheco (2020), en cuatro clases; sin vegetación, vegetación muy escasa, vegetación media, vegetación densa y vegetación muy densa con sus respectivos rangos. Se realizó el cálculo de los promedios acumulados de mayor y menor superficie para el período 1998-2019.

### Cuadro 1. Rangos de la reclasificación del índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI).

### Cuadro 1. Rangos de la reclasificación del índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI).

NDVI	Cobertura y uso de la tierra
<0	Sin vegetación
0 – 0,2	Vegetación muy escasa
0,2 – 0,35	Vegetación media
0,35 – 0,6	Vegetación densa
>0,6	Vegetación muy densa

### Procesamiento de datos pluviométricos

Se utilizaron los montos totales anuales de precipitación, para la estación Portoviejo de la base de datos del Instituto Nacional de Hidrología y Meteorología (INAMHI, 2020), para los mismos años de las imágenes satelitales (1998-2019).

### Modelo de correlación polinomial del NDVI y la precipitación anual

Para el modelo de correlación entre el NDVI y la precipitación, se siguió la metodología de Hongshuai *et al.* (2019), donde se analiza la vegetación y el cambio climático mediante una

the same years of the satellite images (1998-2019).

### Polynomial correlation model of NDVI and annual precipitation

For the correlation model between NDVI and precipitation, the methodology of Hongshuai *et al.* (2019) was followed, where vegetation and climate change are analyzed through a partial correlation. The partial correlation was adjusted to an  $R^2$  with a polynomial trend.

### Results and discussion

#### Temporal and spatial variation of the NDVI

With the Landsat images, the NDVI was obtained for the different selected years of the study period (Figure 2, in graphs 2-6) in shades of green the different vegetation covers are shown and in yellowish and reddish colors the areas with little and no cover vegetable. In general, a very heterogeneous dynamics of the NDVI is observed. For the year 1998, the dense and very dense vegetation cover practically in the entire province



correlación parcial. La correlación parcial se ajustó a un  $R^2$  con tendencia polinomial.

**Resultados y discusión**

**Variación temporal y espacial del NDVI**

Con las imágenes Landsat se obtuvo el NDVI para los distintos años seleccionados del período de estudio (Figura 2, en gráficos 2-6) en tonalidades de verde se muestran las diferentes coberturas vegetales y en colores amarillentos y rojizos las zonas con escasa y sin cobertura vegetal. En general se observa una dinámica muy heterogénea del NDVI. Para el año 1998 destaca la cobertura vegetal densa y muy densa prácticamente en toda la provincia de Manabí, debido a las elevados montos de precipitación en toda la región producto del fenómeno El Niño (Pacheco *et al.*, 2017).

of Manabí stands out, due to the high amounts of precipitation throughout the region as a result of the El Niño phenomenon (Pacheco *et al.*, 2017).

For the rest of the years (2004, 2006, 2010, 2016, 2019) a differential behavior with relatively low NDVI values is observed in the northern part of the Portoviejo river basin, coinciding with areas of low topography and semi-arid conditions close to the river mouth in the Pacific Ocean. The vegetation in these areas of the basin undergoes alteration processes, among other things due to the expansion of the agricultural frontier and unsustainable agronomic practices (Lemos, 2019).

de escasa o nula vegetación, lo cual se debe a la presencia abundante de la nubosidad que enmascara la vegetación, dando la falsa sensación de la presencia de zonas homogéneas extensas sin cobertura vegetal.

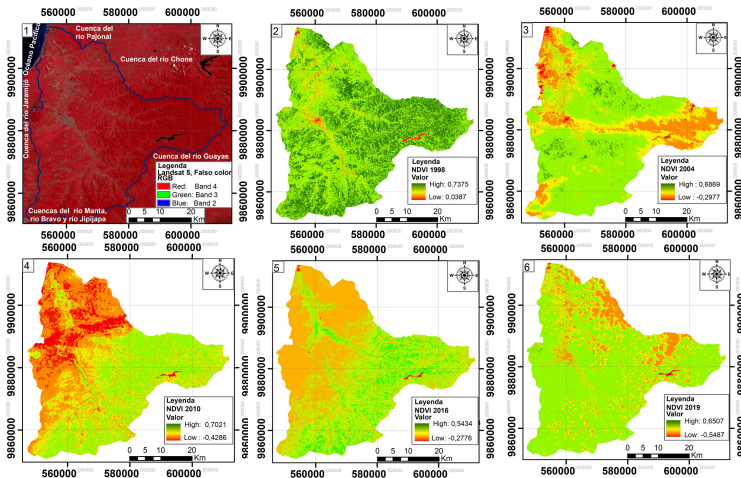


Figura 2. Distribución temporal y espacial del NDVI, en gráficos 2-6, Portoviejo – Ecuador.

Figure 2. Temporal and spatial distribution of the NDVI, in graphs 2-6, Portoviejo - Ecuador.



Para el resto de los años (2004, 2006, 2010, 2016, 2019) se observa un compartamiento diferencial con valores de NDVI relativamente bajos en la parte norte de la cuenca del río Portoviejo, coincidiendo con áreas de baja topografía y condiciones semiáridas cercanas a la desembocadura del río en el Océano Pacífico. La vegetación en estas zonas de la cuenca sufre procesos de alteración, entre otras cosas por la expansión de la frontera agrícola y prácticas agronómicas poco sostenibles (Lemos, 2019).

En el sector sur y este de la cuenca, perteneciente a la parte montañosa de la misma se concentran valores altos de NDVI para la mayoría de los años. Sin embargo, llama la atención la presencia de colores rojos en áreas homogéneas, indicativos de escasa o nula vegetación, lo cual se debe a la presencia abundante de la nubosidad que enmascara la vegetación, dando la falsa sensación de la presencia de zonas homogéneas extensas sin cobertura vegetal.

Los parches rojos distribuidos indistintamente en la parte alta y media de la cuenca, representan áreas de actividades agropecuarias variadas que impactan negativamente sobre la cobertura vegetal.

### **Dinámicas del NDVI y los registros pluviométricos**

El NDVI desde 1998 hasta el 2019 refleja una dinámica temporal muy activa. Los resultados (Cuadro 2) mostraron que, a escala de la cuenca, la vegetación experimentó una tendencia, reportada por Hongshuai *et al.* (2019) como reverdecimiento

In the southern and eastern sector of the basin, belonging to the mountainous part of the basin, high values of NDVI are concentrated for most of the years. However, the presence of red colors in homogeneous areas is striking, indicative of little or no vegetation, which is due to the abundant presence of cloudiness that masks the vegetation, giving the false feeling of the presence of large homogeneous areas without plant cover.

The red patches distributed indistinctly in the upper and middle part of the basin, represent areas of varied agricultural activities that negatively impact the vegetation cover.

### **Dynamics of NDVI and fluviometric records**

The NDVI from 1998 to 2019 reflects a highly active temporal dynamic. The results (Table 2) showed that, at the basin scale, the vegetation experienced a trend, reported by Hongshuai *et al.* (2019) as discontinuous greening, registering years (1998, 2004, 2019) with remarkably high average NDVI; this can be attributed to the influence of precipitation, which, with the exception of 2004, coincides with rainfall amounts above the historical average of 631.85 mm per year.

Special mention should be made of the year 1998 for showing itself as an anomaly, with precipitation records (1699 mm) almost three times the average and a NDVI (0.53), corresponding to a dense vegetation cover, much higher than the other years. This circumstance is due to the occurrence, for that year, of the most

discontinuo, registrándose años (1998, 2004, 2019) con el NDVI promedio muy alto; esto puede atribuirse a la influencia de la precipitación, que, a excepción del año 2004, coincide con montos pluviométricos por encima de la media histórica de 631,85 mm anuales.

intense El Niño phenomenon that has occurred in the Ecuadorian territory, according to Thielen *et al.* (2015) the rains and thermal anomalies were exceptional, reporting an increase in temperature of 0.44°C.

For the rest of the years studied, the NDVI oscillates in the range of

**Cuadro 2. Valores de NDVI, precipitación en el período 1998 – 2019.**

**Table 2. NDVI values, precipitation in the period 1998 – 2019.**

Año	NDVI				Precipitación (mm)
	Min.	Max.	Mean.	Std. Dev	
1998	-0,38	0,71	0,53	0,12	1699,00
2000	-0,39	0,70	0,33	0,15	342,90
2002	-0,67	0,64	0,27	0,24	713,70
2004	-0,30	0,69	0,37	0,16	359,00
2006	-0,48	0,71	0,25	0,27	408,50
2008	-0,63	0,64	0,31	0,21	670,90
2010	-0,43	0,70	0,25	0,18	745,90
2012	-0,55	0,67	0,27	0,16	878,90
2014	-0,26	0,59	0,32	0,11	284,10
2016	-0,28	0,54	0,23	0,09	448,10
2018	-0,18	0,64	0,32	0,14	381,40
2019	-0,19	0,65	0,40	0,14	649,80

Mención especial requiere el año 1998 por mostrarse como una anomalía, con registros de precipitación (1.699 mm) casi tres veces el promedio y un NDVI (0,53), correspondiente a una cobertura vegetal densa, muy superior a los otros años. Esta circunstancia se debe a la ocurrencia, para ese año, del fenómeno El Niño más intenso que se ha presentado en el territorio ecuatoriano, según Thielen *et al.* (2015) las lluvias y anomalías térmicas fueron excepcionales, reportando un incremento de la temperatura de 0,44°C.

0.2 - 0.35 corresponding to an average vegetation cover, where the growth of the vegetation varies depending on the availability of the water resource. The temporal distribution of precipitation, for the study period, shows a highly variable behavior with recurrence of extraordinary rain and drought events, significantly distancing itself from the historical average. According to Pacheco *et al.* (2019) the occurrence of extreme events in the last 20 years on the Ecuadorian coast corresponds

Para el resto de los años estudiados el NDVI oscila en el rango de 0,2 – 0,35 correspondiente a una cobertura vegetal media, donde el crecimiento de la vegetación varía en función de la disponibilidad del recurso hídrico. La distribución temporal de la precipitación, para el período de estudio, muestra un comportamiento muy variable con recurrencia de eventos de lluvias y sequías extraordinarias, distanciándose significativamente del promedio histórico. Según Pacheco *et al.* (2019) la ocurrencia de eventos extremos de los últimos 20 años en la costa ecuatoriana se corresponde con cuatro sequías (1988, 1990, 1991 y 2003) y cuatro lluvias extraordinarias (1997, 1998, 2011 y 2017) (Figura 3). Estos eventos extremos están fuertemente influenciados por las variaciones de Temperatura Superficial del Mar (TSM) reflejadas como anomalías térmicas. Los autores confirman el supuesto de que las anomalías térmicas positivas en el Pacífico ecuatorial, inciden positivamente en la ocurrencia de lluvias extraordinarias.

to four droughts (1988, 1990, 1991 and 2003) and four extraordinary rains (1997, 1998, 2011 and 2017) (Figure 3). These extreme events are strongly influenced by variations in Sea Surface Temperature (SST) reflected as thermal anomalies. The authors confirm the assumption that positive thermal anomalies in the equatorial Pacific have a positive effect on the occurrence of extraordinary rains.

The low NDVI coincidences for the years 2002 and 2012 with high rainfall records could be related to the lower number of hours of sun available for photosynthesis, due to the persistent cloudiness in some areas of the study area, which is consistent with the findings of Hongshuai *et al.* (2019).

On the other hand, the relatively high NDVI results for the years 2000 and 2014 with considerably low rainfall amounts, can be explained by the delayed action of drought on vegetation. In this regard, Luo *et al.* (2020) report effects of drought on vegetation with lags of up to five years. In the case of the Portoviejo river basin, the lagged effects of the

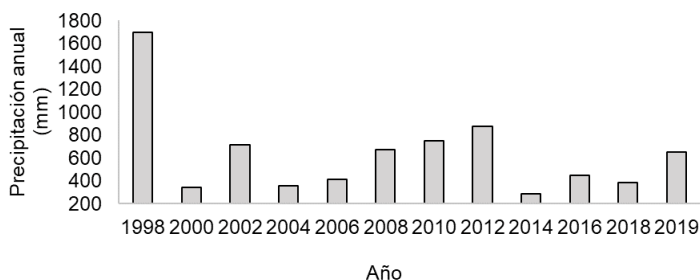


Figura 3. Distribución temporal de la precipitación anual en la estación Portoviejo 1998-2019 (INAMHI, 2020), Portoviejo – Ecuador.

Figure 3. Temporal distribution of annual precipitation in Portoviejo station 1998-2019 (INAMHI, 2020), Portoviejo - Ecuador.

Las coincidencias de NDVI bajos para los años 2002 y 2012 con altos registros pluviométricos pudiera estar relacionado con la menor cantidad de horas de sol disponibles para la fotosíntesis, debido a la persistente nubosidad en algunas zonas del área de estudio, lo cual es consistente con los hallazgos de Hongshuai *et al.* (2019).

Por otro lado, los resultados de NDVI relativamente altos para los años 2000 y 2014 con montos pluviométricos considerablemente bajos, se puedan explicar por la acción retardada de la sequía sobre la vegetación. Al respecto Luo *et al.* (2020) reportan efectos de la sequía sobre la vegetación con rezagos hasta de cinco años. Para el caso de la cuenca del río Portoviejo los efectos rezagados de la sequía se hacen evidentes en el descenso del NDVI hasta 0,27 y 0,23 para los años 2002 y 2016 respectivamente, después de sequías considerables en los años 2000 y 2014.

### **Análisis multitemporal del NDVI reclasificado en función de la cobertura vegetal**

Con los datos reclasificados de NDVI (Cuadro 3), se analizaron los cambios ocurridos en la vegetación a lo largo de estas dos décadas, mostrando la cobertura vegetal para cada clase en área km<sup>2</sup> y porcentaje para cada año de estudio.

La vegetación densa presenta el porcentaje de mayor cobertura en la cuenca con valores superiores al 30 % a excepción del año 2016 que registra un descenso muy marcado de este tipo de cobertura y con toda seguridad se puede explicar con la ocurrencia de sequías sostenidas desde el 2014.

drought are evident in the decrease of the NDVI to 0.27 and 0.23 for the years 2002 and 2016 respectively, after considerable droughts in 2000 and 2014.

### **Multitemporal analysis of NDVI reclassified based on vegetation cover**

With the reclassified data from NDVI (Table 3), the changes that occurred in the vegetation throughout these two decades were analyzed, showing the vegetation cover for each class in area km<sup>2</sup> and percentage for each year of study.

Dense vegetation presents the highest percentage of coverage in the basin with values higher than 30%, except for 2016, which registers a very marked decrease in this type of coverage and it can certainly be explained by the occurrence of sustained droughts since 2014.

On the other hand, the vegetation with medium coverage occupies the second place, with respect to the surface covered over the basin. The year 1998 presents an atypical decrease in this coverage, with only 6.39%, which is due to the predominance of dense and very dense vegetation for that year, due to the high rainfall amounts of the years 1997 and 1998, associated with the El Niño phenomenon previously reported.

Very sparse vegetation occupies third place in coverage area, with a significant decrease for the year 1998, which is consistent with the predominance of dense vegetation cover for this year due to the high amounts of precipitation.

Por su parte la vegetación con cobertura media ocupa el segundo lugar, respecto a la superficie cubierta sobre la cuenca. El año 1998 presenta un descenso atípico en esta cobertura, con apenas el 6,39 %, lo cual obedece al predominio de la vegetación densa y muy densa para ese año, producto de los elevados montos pluviométricos de los años 1997 y 1998, asociados al fenómeno El Niño reparatado previamente.

La vegetación muy escasa ocupa el tercer lugar en área de cobertura, con un descenso significativo para el año 1998, lo cual es consistente con el predominio de la cobertura vegetal densa para este año producto de los altos montos de precipitación.

Para el caso de las coberturas de suelo desnudo o áreas sin vegetación se presenta un descenso significativo en el año 2006, lo cual posiblemente esté condicionado por los efectos de la sequía en años previos.

Finalmente, la presencia dominante de la vegetación muy densa para el año 1998, obedece a la acción de las fuertes precipitaciones asociadas con el fenómeno El Niño 1997-1998.

En resumen las acciones que pueden haber influenciado el comportamiento de la dinámica vegetal antes descrita, son la alta deforestación por actividades antropogénicas, superior a 6.000 ha.año<sup>-1</sup>, incremento de temperatura en 0,8 °C de 1960 a 2006, y aumento en las precipitaciones en zonas de la costa cercano al 90 % y una disminución de las mismas superior al 20 % en la zona agrícola, condicionando niveles de

In the case of bare ground covers or areas without vegetation, there is a significant decrease in 2006, which is possibly conditioned by the effects of the drought in previous years.

Finally, the dominant presence of very dense vegetation for 1998 is due to the action of heavy rainfall associated with the 1997-1998 El Niño phenomenon.

In summary, the actions that may have influenced the behavior of the above-described plant dynamics are high deforestation due to anthropogenic activities, higher than 6,000 ha.year<sup>-1</sup>, an increase in temperature of 0.8°C from 1960 to 2006, and an increase in the precipitations in coastal areas close to 90% and a decrease of the same over 20% in the agricultural area, conditioning levels of vulnerability low (13.30%), medium (34.74%), high (45.53%), and very high (6.43%) (Macias *et al.*, 2019).

### **Correlation between NDVI and annual precipitation.**

The correlation between NDVI and precipitation was studied through a second-order polynomial model, Figure 4, because it presented the best fit of the determination coefficient ( $R^2 = 0.76$ ), which indicates that in 76% of the cases, the variations in the NDVI are due to the influence of precipitation and the remaining 24% can be explained by several factors, where anthropogenic activities stand out, the same as according to Chu *et al.* (2019) can lead to soil degradation. In the study area, extensive agricultural activities are evidenced with a

vulnerabilidad baja (13,30 %), media (34,74 %), alta (45,53 %), y muy alta (6,43 %), (Macias *et al.*,2019).

strong predominance of grasslands, as shown in the map of use and land cover of the MAG (2014).

**Cuadro 3. Valores de NDVI en el período 1998 – 2019.**

**Table 3. NDVI values in the period 1998 - 2019**

Año	Cobertura Vegetal										Total
	Sin V.		V. ME		V. Media		V. Densa		V. MD		
	<0	>0	0 – 0,2	>0,2	0,2 – 0,35	>0,35	0,35 – 0,6	>0,6	>0,6	>0,6	
	(km <sup>2</sup> )	(%)	(km <sup>2</sup> )	(%)	(km <sup>2</sup> )	(%)	(km <sup>2</sup> )	(%)	(km <sup>2</sup> )	(%)	(km <sup>2</sup> )
1998	7,13	0,33	45,96	2,15	136,23	6,39	1277,45	59,89	666,06	31,23	2132,82
2000	28,92	1,36	391,08	18,34	698,15	32,73	999,60	46,87	15,08	0,71	2132,83
2002	404,66	18,97	285,84	13,40	345,41	16,19	1096,59	51,41	0,37	0,02	2132,86
2004	24,12	1,13	338,47	15,87	486,45	22,81	1245,06	58,38	38,81	1,82	2132,91
2006	553,86	25,97	312,96	14,67	323,69	15,18	818,89	38,39	123,47	5,79	2132,87
2008	246,12	11,54	280,97	13,17	388,47	18,21	1217,16	57,07	0,13	0,01	2132,86
2010	215,86	10,12	683,54	32,05	507,71	23,80	723,29	33,91	2,47	0,12	2132,87
2012	128,05	6,00	589,48	27,64	629,35	29,51	785,39	36,82	0,56	0,03	2132,83
2014	1,31	0,06	409,10	19,18	756,33	35,46	966,12	45,30	0,00	0,00	2132,86
2016	4,22	0,20	870,03	40,79	1045,68	49,03	212,94	9,98	0,00	0,00	2132,87
2018	0,68	0,03	464,29	21,77	666,24	31,24	1000,14	46,89	1,48	0,07	2132,83
2019	4,83	0,23	256,71	12,04	384,88	18,05	1482,28	69,50	4,21	0,20	2132,92
<b>X</b>	<b>134,98</b>		<b>410,70</b>		<b>530,72</b>		<b>985,41</b>		<b>71,05</b>		

V = Vegetación; ME = Muy Escasa; MD = Muy Densa; X=Promedio

V = Vegetation; ME = Very Scarce; MD = Very Dense; X = Average

**Correlación entre el NDVI y la precipitación anual.**

Se estudió la correlación entre el NDVI y la precipitación a través de un modelo polinomial de segundo orden, Figura 4, por presentar el mejor ajuste del coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>

Figure 4 shows that the low NDVI values (less than 0.35) present a totally dispersed pattern with respect to rainfall, however, from there they reflect a clear positive trend, and this behavior can be represented through a second order polynomial regression

= 0,76), lo cual indica que en el 76 % de los casos las variaciones en el NDVI obedecen a la influencia de la precipitación y el restante 24 % puede explicarse por varios factores, donde destacan las actividades antropogénicas, mismas que de acuerdo a Chu *et al.* (2019) pueden conducir a la degradación del suelo. En el área de estudio se evidencian actividades agropecuarias extensivas con fuerte predominio de pastizales, según se muestra en el mapa de uso y cobertura del suelo del MAG, (2014).

model. Low magnitude NDVI results could be related to other variables such as temperature and changes in the soil due to anthropogenic activities.

## Conclusions

The NDVI shows a regularly active and heterogeneous dynamics in the study area, evidencing the predominance of scarce and null vegetation cover in the lower part of the basin in most years.

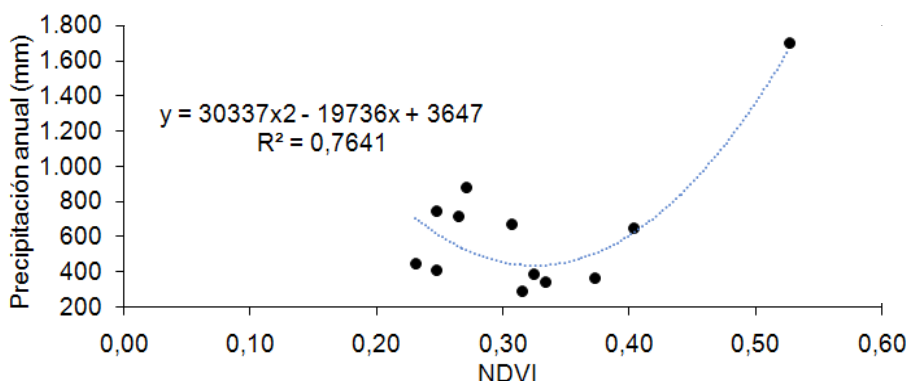


Figura 4. Correlación entre el NDVI y la precipitación durante el período 1998 – 2019, Portoviejo – Ecuador.

Figure 4. Correlation between NDVI and precipitation during the period 1998 - 2019, Portoviejo - Ecuador.

En la figura 4 se observa que los valores bajos de NDVI (inferiores a 0,35), presentan un patrón totalmente disperso respecto a las precipitaciones, no obstante, a partir de allí reflejan una clara tendencia positiva pudiendo representarse este comportamiento a través de un modelo de regresión polinomial de segundo orden. Los resultados de baja magnitud de NDVI, pudieran estar relacionados con otras

The high NDVI values, and therefore, dense and very dense vegetation cover, are concentrated in homogeneous areas in the middle and upper part of the basin.

The vegetation shows a discontinuous greening trend determined by the differential influence of precipitation.

There is a direct influence of the precipitation on the NDVI, with a



variables como la temperatura y los cambios en el suelo por actividades antropogénicas.

## Conclusiones

El NDVI muestra una dinámica muy activa y heterogénea en el área de estudio, evidenciándose el predominio de la cobertura vegetal escasa y nula en la parte baja de la cuenca en la mayoría de los años.

Los valores altos de NDVI, y por lo tanto, cobertura vegetal densa y muy densa, se concentran en zonas homogéneas en la parte media y alta de la cuenca.

La vegetación muestra una tendencia de reverdecimiento discontinuo determinado por la influencia diferencial de la precipitación.

Hay una influencia directa de la precipitación sobre el NDVI, con un coeficiente de determinación de 76 %.

La sequía evidencia una influencia rezagada sobre la vegetación, disminuyendo el NDVI hasta 2 años después de presentarse esta condición climática.

## Literatura citada

Cadena, A. G., Martínez, M. R., Cárdenas, J. M., Vilchez, S. M. y Harvey, C. A. 2019. Uso de prácticas de Adaptación basada en Ecosistemas por pequeños cafetaleros en Centroamérica. *Agron. Mesoam.* 30(1): 1-18. Disponible en: <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.32615>. Fecha de consulta: agosto 2020.

EROS - Earth Resources Observation and Science. 2017. Landsat Quality Assessment ArcGIS Toolbox. U.S. Geological Survey. Disponible en: <https://doi.org/10.5066/f7jm284n>. Fecha de consulta: agosto 2020.

coefficient of determination of 76%.

The drought shows a lagged influence on the vegetation, decreasing the NDVI up to 2 years after this

## *End of English Version*

Feng, T., Martin, B., Yi Y, Liu., Aleixandre, V., Torbern T., Abdoul, A. D., Kjeld R., Cheikh, M., Yunjia, W. and Rasmus, F. 2016. Remote sensing of vegetation dynamics in drylands: Evaluating vegetation optical depth (VOD) using AVHRR NDVI and in situ green biomass data over West African Sahel. *Remote Sensing of Environment.* 177: 265-276. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.rse.2016.02.056>. Fecha de consulta: junio 2020.

Fua, B. and Burgher, I. 2015. Riparian vegetation NDVI dynamics and its relationship with climate, surface water and groundwater. *Journal of Arid Environment.* 113: 56-68. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2014.09.010>. Fecha de consulta: agosto 2020.

Hongshuai, C., Sergey, V., Chao, W. and Menghui, W. 2019. NDVI-based vegetation dynamics and its response to climate changes at Amur-Heilongjiang River Basin from 1982 to 2015. *Science of the Total Environment.* 652(2): 2051-2062. Disponible en: <https://www.researchgate.net/deref/https%3A%2F%2Fdoi.org%2F10.1016%2Fj.scitotenv.2018.09.115>. Fecha de consulta: agosto 2020.

Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. Anuarios Meteorológicos (INAMHI). 1998, 2000, 2002, 2004, 2006, 2007, 2008, 2010, 2012, 2014, 2016, 2018, 2019. Disponible en: <http://www.forosecuador.ec/forum/ecuador/educaci%C3%B3n-y-ciencia/35393-inamhi-anuarios-meteorol%C3%B3gicos-en-pdf>. Fecha de consulta: mayo 2020.

Lemos, V. E. 2019. Globalización y reestructuración productiva

- agropecuaria en el Bioma de Cerrados del Centro-Norte de Brasil (Matopiba). *Revista Austral de Ciencias Sociales* 38: 291-311. Disponible en: <http://revistas.uach.cl/index.php/racs/article/view/6117/7218>. Fecha de consulta: diciembre 2020.
- Lijun, Z., Jijun, M. and Likai, Z. 2020. Applying Geodetector to disentangle the contributions of natural and anthropogenic factors to NDVI variations in the middle reaches of the Heihe River Basin. *Ecological Indicators*. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106545>. Fecha de consulta: agosto 2020.
- Luo, N., Mao D., Wen, B. and Liu, X. 2020. Climate Change Affected Vegetation Dynamics in the Northern Xinjiang of China: Evaluation by SPEI and NDVI. *Land*. 9(3). Disponible en: <https://doi.org/10.3390/land9030090>. Fecha de consulta: agosto 2020.
- Macías, R. B., Cuenca, G. N., Intriago, F.F., Caetano, C. M., Menjivar, J. F. and Pacheco, H. G. 2019. Vulnerability to climate change of smallholder cocoa producers in the province of Manabí, Ecuador. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*. 72(1): 8707-8716. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15446/rfnam.v72n1.72564>. Fecha de consulta: agosto 2020.
- Mas, M. M. 2017. Uso de la teledetección y los SIG en la vigilancia de la calidad del agua: Aplicación al Mar Menor. Cartagena Mar Menor. Universidad Politécnica de Cartagena, España. 73p. Disponible en: <https://repositorio.upct.es/xmlui/bitstream/handle/10317/6353/tfg-mas-uso.ence=2&isAllowed=y>. Fecha de consulta: agosto 2020.
- Millano, J. L. y Paredes, P. F. 2016. Variabilidad de la Vegetación con el Índice De Diferencia Normalizada (NDVI) en Latinoamérica. *Novum Scientiarum*. 2: 33-44. Disponible en: [https://www.academia.edu/30688889/VARIABILIDAD\\_DE\\_LA\\_VEGETACION\\_CON\\_EL\\_INDICE\\_DE\\_DIFERENCIA\\_NORMALIZADA\\_NDVI\\_EN\\_LATINOAMERICA](https://www.academia.edu/30688889/VARIABILIDAD_DE_LA_VEGETACION_CON_EL_INDICE_DE_DIFERENCIA_NORMALIZADA_NDVI_EN_LATINOAMERICA). Fecha de consulta: agosto 2020.
- Pacheco, H. A., Montilla, A. J., Méndez, W. J., Delgado, M. H. y Zambrano, D. 2019. Causas y consecuencias de las lluvias extraordinarias de 2017 en la costa ecuatoriana: el caso de la provincia Manabí. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*. 48(2): 45-70. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/mar/v48n2/0122-9761-mar-48-02-45.pdf>. Fecha de consulta: agosto 2020.
- Pacheco, H. A., Zamora, E. L. y Jarre, E. C. 2020. Variaciones de la cobertura vegetal empleando el índice normalizado de diferencia de vegetación para monitorear ODS en Manabí – Ecuador. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia. Especial(2)*: 12-18. Disponible en: <https://doi.org/10.22209/rt.ve2020n2a02>. Fecha de consulta: agosto 2020.
- Paula, A. P., Zambrano, L. y Paula, P. 2018. Análisis Multitemporal de los cambios de la vegetación, en la Reserva de Producción de Fauna Chimborazo como consecuencia del cambio climático. *Enfoque UTE*. 9(2): 125-137. Disponible en: <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v9n2.252>. Fecha de consulta: agosto 2020.
- Quintana, F. S. 2017. Dinámica, escalas y dimensiones del cambio climático. Tla-melaua. *Revista de Ciencias Sociales*. 10(41): 180-200. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/tla/v10n41/1870-6916-tla-10-41-00180.pdf>. Fecha de consulta: agosto 2020.
- Rodríguez, N. R., Iloch, I. G., Galano, D. S., Estrada, R. E. y Morales, G. M. 2009. Software para corregir los datos inválidos en las imágenes Landsat 7. *Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente*. (17). Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/285601066\\_Software\\_para\\_corregir\\_los\\_datos\\_invalidos\\_en\\_las\\_imagenes\\_Landsat\\_7](https://www.researchgate.net/publication/285601066_Software_para_corregir_los_datos_invalidos_en_las_imagenes_Landsat_7). Fecha de consulta: agosto 2020.
- Rouse, J., Haas, R., Deering, D., Schell, J.A. y Harlan, J. 1974. Monitoring the vernal advancement and retrogradation (green wave effect) of natural vegetation. *Remote Sensing Center, NASA*. 73: 1-93. Disponible en: <https://ntrs.nasa.gov/citations/19730017588>. Fecha de consulta: agosto 2020.

- Ruiz, A. C. y Pacheco, H. A. 2020. Estimación del Factor C de la RUSLE en la microcuenca del río Lodana, Ecuador, usando imágenes del satélite Sentinel 2. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia. Especial* (2): 123-129. Disponible en: <https://doi.org/10.22209/rt.ve2020n2a10>. Fecha de consulta: agosto 2020.
- Salinas, C. X., Martínez, R. R. y Morales, M. Z. 2017. Tendencia en el siglo XXI del Índice de Diferencias Normalizadas de Vegetación (NDVI) en la parte sur de la península de Baja California. *Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía*. (94): 82-90. Disponible en: <https://doi.org/10.14350/ig.57214>. Fecha de consulta: agosto 2020.
- Shengzhi, H., Xudong, Z., Lan, M., Hao W., Qiang, H., Guoyong, L., Erhao, M. and Yi, G. 2020. Quantitative contribution of climate change and human activities to vegetation cover variations based on GA-SVM model. *Journal of Hydrology*. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2020.124687>. Fecha de consulta: agosto 2020.
- Thielen, D., Cevallos, J., Erazo, T., Zurita, S., Figueroa, J., Quintero, J., Matute, N., Velázquez, G. y Puche, M. 2015. Dinámica de eventos climáticos extremos en la cuenca del río Portoviejo, Manabí, Ecuador. *Rev. La Técnica*.14(14): 80-91. Disponible en: [https://doi.org/10.33936/la\\_tecnica.v0i14.585](https://doi.org/10.33936/la_tecnica.v0i14.585). Fecha de consulta: agosto 2020.
- Vega, M. A. y Alvarado, R. B. 2019. Análisis de las series de tiempo de variables biofísicas para cuatro ecorregiones de Guanacaste, Costa Rica. *Revista de Ciencias Ambientales*. 53(2): 60-96. Disponible en: <https://doi.org/10.15359/rca.53-2.4>. Fecha de consulta: agosto 2020.
- Yan-Ling, S., Mei, S., Xin-Rui, P., Xia-Kun, Z. and Yan-Li, Y. 2020. Assessment of the impacts of climate change and human activities on vegetation cover change in the Haihe River basin, China. *Physics and Chemistry of the Earth*. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pce.2019.102834>. Fecha de consulta: agosto 2020.
- Zoran, M. A., L. F. Zoran, and Adrián, I. D. 2016. Forest vegetation dynamics and its response to climate changes. *Remote Sensing for Agriculture, Ecosystems, and Hydrology*. Disponible en: <https://doi.org/10.1117/12.2241374>. Fecha de consulta: agosto 2020.







Nota técnica / Technical note

## Efecto del método de extracción de líquido ruminal en la técnica de gas *in vitro*

Effect of the ruminal liquid extraction method in the *in vitro* gas technique

Efeito do método de extração de líquido ruminal na técnica de gases *in vitro*

Roselia Ramírez Díaz<sup>1</sup>, René Pinto Ruiz<sup>2\*</sup>, Francisco Guevara Hernández<sup>2</sup>, José Apolonio Venegas Venegas<sup>2</sup>, Mariela Beatriz Reyes Sosa<sup>1,2</sup> y Luis Alberto Miranda Romero<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudiante de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Sustentabilidad, Universidad Autónoma de Chiapas. Correo electrónico: (RR) [ramirez.rrd@gmail.com](mailto:ramirez.rrd@gmail.com), . <sup>2</sup> Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Agronómicas, carretera Ocozocoautla-Villaflores km 84.5, Villaflores, Chiapas, México, C. P. 30470. Correo electrónico: (RP) [pinto\\_ruiz@yahoo.com.mx](mailto:pinto_ruiz@yahoo.com.mx), ; (FG) [francisco.guevara@unach.mx](mailto:francisco.guevara@unach.mx), ; (JV) [polo\\_tex1@hotmail.com](mailto:polo_tex1@hotmail.com), ; (MR) [mareso84@gmail.com](mailto:mareso84@gmail.com), ; (LM) [debraj.aryal@hotmail.com](mailto:debraj.aryal@hotmail.com), .

### Resumen

Los estudios de gas *in vitro* requieren del uso de animales canulados; sin embargo, el alto costo de la cirugía limita su aplicación. Por lo que, el objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la técnica de extracción de líquido ruminal por sonda oro-ruminal sobre los resultados derivados de la técnica de producción de gas *in vitro* (TPG). La harina de *Elaeis guineensis* se utilizó como sustrato. El líquido ruminal se obtuvo de dos formas: de animales canulados y sonda oro-ruminal. Se estimó la degradación de la materia seca (DGRMS), parámetros de la cinética de fermentación y volumen fraccional por la TPG. La comparación de medias se realizó utilizando el procedimiento de Tukey ( $p < 0,05$ ). Los resultados indicaron la falta de diferencias estadísticas significativas ( $p > 0,05$ ). Se concluyó que, la técnica de extracción de líquido ruminal, no modificó la DGRMS, los parámetros y fracciones de fermentación de *E. guineensis*. **Palabras clave:** *in vitro*, ovinos, degradación, fermentación.

Recibido el 25-08-2020 • Aceptado el 25-07-2020

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [pinto\\_ruiz@yahoo.com.mx](mailto:pinto_ruiz@yahoo.com.mx)

## Abstract

*In vitro* gas studies require the use of cannulated animals; however, the high cost of the surgery limits its application. Therefore, the objective of the study was to evaluate the effect of the ruminal fluid extraction technique by oro-ruminal probe affects the results derived from the *in vitro* gas production technique (GPT). *Elaeis guineensis* meal was used as a substrate. Ruminal fluid was obtained in two ways: cannulated animals and oro-ruminal probe. Dry matter degradation was estimated (DMD), parameters of fermentation kinetics and fractional volume by the GPT. The comparison of means was carried out using the Tukey procedure ( $p < 0.05$ ). The results indicated the lack of significant statistical differences ( $p > 0.05$ ). It was concluded that the ruminal fluid extraction technique did not modify the DGRMS, the parameters and fermentation fractions of *E. guineensis*.

**Key words:** *in vitro*, sheep, degradation, fermentation.

## Resumo

Os estudos de gases *in vitro* requerem o uso de animais canulados; entretanto, o alto custo da cirurgia limita sua aplicação. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da técnica de extração de fluido ruminal por sonda ororruminal sobre os resultados derivados da técnica de produção de gás *in vitro* (TPG). Farinha de *Elaeis guineensis* foi usada como substrato. O líquido ruminal foi obtido de duas formas: de animais canulados e sonda ororruminal. A degradação da matéria seca (DGRMS), os parâmetros cinéticos da fermentação e o volume fracionário foram estimados por TPG. A comparação das médias foi realizada pelo procedimento de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados indicaram a ausência de diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ). Concluiu-se que a técnica de extração do fluido ruminal não modificou o DGRMS, os parâmetros e as frações de fermentação de *E. guineensis*.

**Palavras-chave:** *in vitro*, ovelha, degradação, fermentação.

## Introducción

La técnica de producción de gas *in vitro* es ampliamente usada para determinar cinética de fermentación de alimentos a través del volumen de gas liberado, producto de la fermentación (Posada y Noguera, 2005), también permite conocer las fracciones de fermentación y estimar energía metabolizable, energía

## Introduction

The *in vitro* gas production technique is widely used to determine the kinetics of food fermentation through the volume of gas released, a product of fermentation (Posada and Noguera, 2005), it also allows to know the fermentation fractions and estimate metabolizable energy, net energy, digestibility of organic matter,

neta, digestibilidad de la materia orgánica, biomasa microbiana y gases efecto invernadero por fermentación entérica (Jiménez-Santiago *et al.*, 2019, Ramírez *et al.*, 2020). No obstante, para realizar este tipo de investigaciones, es necesario contar con animales canulados para obtener inóculo a partir del líquido ruminal (Vargas-Bayona *et al.*, 2013), lo que limita su implementación en diversos laboratorios, debido a los altos costos de la cirugía, el manejo sanitario de los animales (Martín *et al.*, 2005) y, en algunos casos, la mortalidad post cirugía, debido a la susceptibilidad de los animales a enfermedades. Por tal razón se han utilizado otras técnicas para obtener líquido ruminal (LR), como es el uso de la sonda oro-ruminal, la cual es económica, práctica y menos invasiva (Shen *et al.*, 2012). Esta técnica se utilizó con éxito para hacer transfaunaciones de animales saludables a otros con desórdenes digestivos y enfermedades metabólicas (Pereira *et al.*, 2018).

Si bien, el uso de animales canulados para la extracción de LR es considerada una forma convincente con relación a los resultados de los estudios que arroja, también deben considerarse las ventajas del uso de sondas oro-ruminales. Sin embargo, no existe información que indique la eficiencia del método de extracción de líquido ruminal por sonda oro-ruminal en los resultados derivados de la técnica de gas *in vitro*, pero se demostró su eficacia al obtener muestras ruminales para conocer el desarrollo de poblaciones microbianas del rumen, determinación de ácidos

microbial biomass and greenhouse gases due to enteric fermentation (Jiménez-Santiago *et al.*, 2019; Ramírez *et al.*, 2020). However, to carry out this type of research, it is necessary to have cannulated animals to obtain inoculum from ruminal fluid (Vargas-Bayona *et al.*, 2013), which limits its implementation in various laboratories, due to the high costs of surgery, animal health management (Martín *et al.*, 2005) and, in some cases, post-surgery mortality due to the animals' susceptibility to diseases. For this reason, other techniques have been used to obtain ruminal fluid (RL), such as the use of the oro-ruminal probe, which is economical, practical and less invasive (Shen *et al.*, 2012). This technique was used successfully to transfaun healthy animals to others with digestive disorders and metabolic diseases (Pereira *et al.*, 2018).

Although the use of cannulated animals for the extraction of LR is considered a convincing way in relation to the results of the studies it produces, the advantages of the use of oro-ruminal probes should also be considered. However, there is no information that indicates the efficiency of the ruminal fluid extraction method by oro-ruminal probe in the results derived from the *in vitro* gas technique, but its effectiveness was demonstrated when obtaining ruminal samples to know the development of microbial populations of the rumen, determination of volatile fatty acids, minerals and pH (Ramos-Morales *et al.*, 2014, Lourenco *et al.*, 2019). Therefore, the objective of the present study was to evaluate

grasos volátiles, minerales y pH (Ramos-Morales *et al.*, 2014, Lourenco *et al.*, 2019). Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar y comparar los resultados obtenidos en la técnica de gas *in vitro* al utilizar líquido ruminal obtenido por cánula o sonda oro-ruminal.

## Materiales y métodos

La investigación se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad Autónoma Chiapas, ubicado en el municipio de Villaflores, Chiapas. La región presenta una precipitación media anual de 1.100 mm y una temperatura media anual de 25 °C. Se utilizó como sustrato harina de palmiste (*Elaeis guineensis*) y fue analizada para determinar materia seca (MS), proteína cruda (PC) según AOAC (2000), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) de acuerdo con la técnica descrita por Van Soest *et al.* (1991).

El líquido ruminal (LR) fue extraído de tres ovinos machos canulados (CR) y de tres ovinos por sonda oro-ruminal (SR), todos de la raza Katahdin de  $42 \pm 1,5$  kg y de aproximadamente un año de edad. Los animales se alimentaron con una dieta isoproteica e isoenergética compuesta de 60 % de pasto *Cynodon nlemfuensis*, 26 % maíz y 14 % harina de palmiste, la cual fue formulada para satisfacer sus necesidades nutricionales de acuerdo a NRC (National Research Council) (NRC, 2007) y en todo momento tuvieron un trato de acuerdo con los protocolos de la Ley Federal

and compare the results obtained in the *in vitro* gas technique when using ruminal fluid obtained by cannula or oro-ruminal probe.

## Materials and methods

The research was carried out in the Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Agronómicas of the Universidad Autónoma Chiapas, located in the municipality of Villaflores, Chiapas. The region has an average annual rainfall of 1,100 mm and an average annual temperature of 25 °C. Palm kernel cake (*Elaeis guineensis*) was used as substrate and it was analyzed to determine dry matter (DM), crude protein (PC) according to AOAC (2000), neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (FDA) according to the technique described by Van Soest *et al.* (1991).

The ruminal fluid (LR) was extracted from three cannulated male sheep (CR) and from three sheep by oro-ruminal probe (SR), all of the Katahdin breed,  $42 \pm 1.5$  kg and approximately one year old. The animals were fed an isoprotein and isoenergetic diet composed of 60 % *Cynodon nlemfuensis* grass, 26 % corn and 14 % palm kernel cake, which was formulated to meet their nutritional needs according to NRC (National Research Council) (NRC, 2007) and at all times they were treated in accordance with the protocols of the Federal Animal Health Law in force, NOM-062-ZOO-1999 and under the animal welfare standards established in Facultad de Ciencias Agronómicas



de Sanidad Animal vigente, NOM-062-ZOO-1999 y bajo las normas de bienestar animal establecidas en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad Autónoma de Chiapas. Antes de la extracción de LR, los ovinos tuvieron un periodo de ayuno de 12 h, ello con la finalidad de conseguir un fluido ruminal mas consistente en composición y actividad (Williams, 2000 y Posada y Noguera, 2005).

Para la extracción de LR por SR se utilizó una manguera de 1,25 m de longitud con un diámetro externo de 1" y 3 mm de espesor de pared, con perforaciones en el extremo que fue introducido en el saco ruminal, el extremo opuesto se conectó a un matraz kitasato para coleccionar el LR y el cual a su vez fue conectado a una bomba de succión. Para introducir la sonda, se utilizó un abre bocas metálico cubierto con una banda de caucho para evitar lesiones. Se extrajo 100 mL de LR/ animal/muestreo, el exceso de saliva se retiró previo a usar el LR.

La cinética de fermentación, fracciones y degradación de la materia seca *in vitro* se determinó mediante el procedimiento descrito por Menke y Steigass (1988), para lo cual se usaron frascos color ámbar de 125 mL de capacidad a los que se les colocó 0,5 g de MS de harina de palmiste. Se preparó una solución mineral reducida compuesta de  $K_2HPO_4$  (0,45 g.L<sup>-1</sup>),  $KH_2PO_4$  (0,45 g.L<sup>-1</sup>),  $NaCO_3$  (0,6 g.L<sup>-1</sup>),  $(NH_4)_2SO_4$  (0,45 g.L<sup>-1</sup>),  $NaCl$  (0,9 g.L<sup>-1</sup>),  $MnSO_4$  (0,18 g.L<sup>-1</sup>),  $CaCl_2$  (0,12 g.L<sup>-1</sup>), L-cisteína (0,25 g.L<sup>-1</sup>) y  $Na_2S$  (0,25 g.L<sup>-1</sup>) y se usaron dos fuentes de líquido ruminal, correspondiente a cada método de

de la Universidad Autónoma de Chiapas. Before the LR extraction, the sheep had a fasting period of 12 h, this in order to achieve a more consistent ruminal fluid in composition and activity (Williams, 2000 and Posada and Noguera, 2005).

For the LR extraction by SR, a 1.25 m long hose with an external diameter of 1" and 3 mm wall thickness was used, with perforations at the end that was introduced into the ruminal sac, the opposite end was it was connected to a kitasato flask to collect the LR and which in turn was connected to a suction pump. To insert the probe, a metal gag covered with a rubber band was used to prevent injury. One hundred (100) mL of LR/ animal/sample was extracted, excess saliva was removed prior to using the LR.

The *in vitro* kinetics of fermentation, fractions and degradation of dry matter were determined by the procedure described by Menke and Steigass (1988), for which amber bottles of 125 mL capacity were used, to which 0.5 g of DM of palm kernel cake was placed. A reduced mineral solution composed of  $K_2HPO_4$  (0.45 g.L<sup>-1</sup>),  $KH_2PO_4$  (0.45 g.L<sup>-1</sup>),  $NaCO_3$  (0.6 g.L<sup>-1</sup>),  $(NH_4)_2SO_4$  (0.45 g.L<sup>-1</sup>) was prepared,  $NaCl$  (0.9 g.L<sup>-1</sup>),  $MnSO_4$  (0.18 g.L<sup>-1</sup>),  $CaCl_2$  (0.12 g.L<sup>-1</sup>), L-cysteine (0.25 g.L<sup>-1</sup>) and  $Na_2S$  (0.25 g.L<sup>-1</sup>) and two sources of ruminal liquid were used, corresponding to each extraction method (cannula and oro-ruminal probe), subsequently and under a continuous flow of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), 90 mL of inoculum were added to each flask diluted ruminal (1:10) according to treatment.

extracción (cánula y sonda ororuminal), posteriormente y bajo un flujo continuo de bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), a cada frasco se le agregaron 90 mL de inóculo ruminal diluido (1:10) de acuerdo al tratamiento.

La presión del gas producido se midió con un manómetro marca Infra modelo 63100/1-4 (0 a 1 kg.cm<sup>-2</sup>) a 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 60, 66 y 72 horas de incubación. Los valores de presión (kg.cm<sup>-2</sup>) se transformaron a volumen de gas (mL.g<sup>-1</sup> materia seca) con la ecuación de regresión (volumen= presión/0,019 con R<sup>2</sup>=0,98), y se estimaron los parámetros de la cinética de producción de gas: volumen máximo (V<sub>máx</sub>; mL.g<sup>-1</sup>), tasa (S; h) y fase de retardo (L; h), para el modelo logístico  $V = V_{máx}/1 + e^{(2.4 * S * (T-L))}$  (Schofield y Pell, 1995), utilizando el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS, 2011). La degradación *in vitro* de la materia seca (DGRMS) se determinó a 72 h. Se calculó por diferencia entre el peso de la materia seca inicial, antes de ser incubada, y el peso de la materia seca residual después de 72 h de incubación. Al final del periodo de incubación, el contenido de cada frasco se filtró a través de papel de filtrado previamente pesado. Los papeles con residuo se secaron a 65 °C por 48 h, se pesaron y se restó el peso del papel filtro. Las fracciones de fermentación se obtuvieron mediante el volumen fraccional (Vf) de gas de fermentación producido a tres intervalos de tiempo: 0 h a 8 h (Vf<sub>0-8</sub>), 8 h a 24 h (Vf<sub>8-24</sub>) y 24 h a 72 h (Vf<sub>24-72</sub>) de incubación, que corresponden a carbohidratos solubles, carbohidratos de reserva

The pressure of the gas produced was measured with an Infra model 63100 / 1-4 (0 to 1 kg.cm<sup>-2</sup>) manometer at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 60, 66 and 72 hours of incubation. The pressure values (kg.cm<sup>-2</sup>) were transformed into gas volume (mL.g<sup>-1</sup> dry matter) with the regression equation (volume = pressure/0.019 with R<sup>2</sup> = 0.98), and the parameters of gas production kinetics were estimated: maximum volume (V<sub>max</sub>; mL.g<sup>-1</sup>), rate (S; h) and lag phase (L; h), for the logistic model  $V = V_{max}/1 + e^{(2.4 * S * (T-L))}$  (Schofield and Pell, 1995), using the SAS Statistical Analysis System (SAS, 2011). *In vitro* degradation of dry matter (DGRMS) was determined at 72 h. It was calculated by the difference between the weight of the initial dry matter, before being incubated, and the weight of the residual dry matter after 72 h of incubation. At the end of the incubation period, the contents of each vial were filtered through pre-weighed filter paper. The papers with residue were dried at 65 °C for 48 h, weighed and the weight of the filter paper was subtracted. The fermentation fractions were obtained by the fractional volume (Vf) of fermentation gas produced at three time intervals: 0 h to 8 h (Vf<sub>0,8</sub>), 8 h to 24 h (Vf<sub>8,24</sub>) and 24 h to 72 h (Vf<sub>24,72</sub>) of incubation, which correspond to soluble carbohydrates, reserve carbohydrates and structural carbohydrates, respectively (Sandoval *et al.*, 2016). These fractional volumes (mL.g<sup>-1</sup>) were transformed into fractions (g.kg<sup>-1</sup>) of fast (FR), medium (FM) and slow (FL) fermentation by means of the following regression

y carbohidratos estructurales, respectivamente (Sandoval *et al.*, 2016). Estos volúmenes fraccionales ( $\text{mL.g}^{-1}$ ) fueron transformados a fracciones ( $\text{g.kg}^{-1}$ ) de rápida (FR), media (FM) y lenta (FL) fermentación mediante las siguientes ecuaciones de regresión (Miranda *et al.*, 2015): FR ( $\text{g.kg}^{-1}$ ) =  $Vf_{0,8}/0,4266$  ( $R^2 = 0,944$ ), FM ( $\text{g.kg}^{-1}$ ) =  $Vf_{8,24}/0,6152$  ( $R^2 = 0,998$ ), FL ( $\text{g.kg}^{-1}$ ) =  $Vf_{24,72}/0,3453$  ( $R^2 = 0,965$ ).

Se evaluaron dos tratamientos con nueve repeticiones en cada uno, las cuales fueron obtenidas de los valores medios, productos de la repetición por tres veces consecutivas del experimento, según recomienda Udén *et al.* (2012).

Se utilizó un diseño completamente al azar con dos tratamientos y nueve repeticiones. Los datos obtenidos de las variables estudiadas se analizaron mediante PROC GLM (SAS, 2011) y las medias de tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## Resultados y discusión

El contenido de MS de la harina de palmiste fue de 91,9 %, con 14,47 % de PC, 69,7 % de FDN y 45,56 % de FDA. Los parámetros de la cinética de fermentación y las fracciones (rápida, media y lenta) de harina de *Elaeis guineensis* inoculada con LR obtenido por CR y por SR no presentaron diferencias estadísticas ( $p > 0,05$ ; Cuadro 1). La tasa de fermentación promedio fue de  $0,0275 \text{ h}^{-1}$ , con una L de 6,575 h, mientras que el  $V_{\text{máx}}$  promedio

equations (Miranda *et al.*, 2015): FR ( $\text{g.kg}^{-1}$ ) =  $Vf_{0,8}/0,4266$  ( $R^2 = 0,944$ ), FM ( $\text{g.kg}^{-1}$ ) =  $Vf_{8,24}/0,6152$  ( $R^2 = 0,998$ ), FL ( $\text{g.kg}^{-1}$ ) =  $Vf_{24,72}/0,3453$  ( $R^2 = 0,965$ ).

Two treatments were evaluated with nine repetitions in each one, which were obtained from the mean values, products of the repetition for three consecutive times of the experiment, as recommended by Udén *et al.* (2012).

A completely randomized design with two treatments and nine repetitions was used. The data obtained from the variables studied were analyzed using PROC GLM (SAS, 2011) and the treatment means were compared with the Tukey test ( $p < 0.05$ ).

## Results and discussion

The DM content of the palm kernel cake was 91.9 %, with 14.47 % of CP, 69.7 % of NDF and 45.56 % of FDA. The parameters of the fermentation kinetics and the fractions (fast, medium and slow) of *Elaeis guineensis* meal inoculated with LR obtained by CR and SR did not present statistical differences ( $p > 0.05$ ; Table 1). The average fermentation rate was  $0.0275 \text{ h}^{-1}$ , with an L of 6.575 h, while the average  $V_{\text{max}}$  was  $316.81 \text{ mL.g}^{-1}$ . For its part, the DGRMS of *E. guineensis* meal at 72 h of incubation showed a similar behavior in both extraction methods ( $p > 0.05$ ).

The lack of differences between the two LR extraction techniques on the variables evaluated is probably due to the fact that the LR obtained by SR

fue de 316,81 mL.g<sup>-1</sup>. Por su parte, la DGRMS de la harina de *E. guineensis* a las 72 h de incubación mostró un comportamiento similar en ambos métodos de extracción ( $p>0,05$ ).

La falta de diferencias entre ambas técnicas de extracción de LR sobre las variables evaluadas, probablemente se deba a que el LR obtenido por SR, no se contaminó con saliva y fue representativo. Lo que concuerda con Martín *et al.* (2005), quienes cuantificaron las poblaciones de bacterias y hongos ruminales en muestras de contenido ruminal obtenidos por CR y SR en bovinos y señalaron que, mientras el LR no se contamine por saliva los resultados serán similares entre sí. Por su parte, Shen *et al.* (2012) y Ramos-Morales *et al.* (2014), no encontraron diferencias en la estimación de ácidos grasos volátiles, amoníaco, lactato, potasio, cloruro, calcio y fósforo y pH, cuando usaron SR y animales canulados, por lo que concluyeron que el uso de SR podría ser una alternativa para tomar muestras ruminales. Por otro lado, Terré *et al.* (2013), no encontraron diferencias en la cuantificación de bacterias gramnegativas y grampositivas al extraer LR por CR y SR, sin embargo, si se presentaron diferencias en la cuantificación de pH y AGV, concluyendo que, a pesar de las diferencias encontradas los resultados obtenidos con las dos técnicas están altamente correlacionadas, por lo que, se puede utilizar un factor de corrección para aproximar ambos métodos y permitir comparaciones entre estudios.

was not contaminated with saliva and was representative. What agrees with Martín *et al.* (2005), who quantified the populations of ruminal bacteria and fungi in samples of ruminal content obtained by CR and SR in bovines and pointed out that, as long as the LR is not contaminated by saliva, the results will be similar to each other. For their part, Shen *et al.* (2012) and Ramos-Morales *et al.* (2014), found no differences in the estimation of volatile fatty acids, ammonia, lactate, potassium, chloride, calcium and phosphorus and pH, when they used SR and cannulated animals, for which they concluded that the use of SR could be an alternative to take ruminal samples. On the other hand, Terré *et al.* (2013), did not find differences in the quantification of gram-negative and gram-positive bacteria when extracting LR by CR and SR, however, there were differences in the quantification of pH and AGV, concluding that, despite the differences found, the results obtained with the two techniques they are highly correlated, therefore, a correction factor can be used to approximate both methods and allow comparisons between studies.

## Conclusions

The extraction of ruminal fluid by cannula or oro-ruminal probe does not affect the results obtained in the *in vitro* gas technique, so they could be used interchangeably.

## Acknowledgement

The authors thank the Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación

### Cuadro 1. Efecto de LR obtenido por cánula y sonda oro-ruminal sobre la degradación de la materia seca, parámetros y fracciones de fermentación de harina de *Elaeis guineensis*.

Table 1. Effect of LR obtained by cannula and oro-ruminal probe on the degradation of dry matter, parameters and fermentation fractions of *Elaeis guineensis* meal.

Variables	Cánula	Sonda oro ruminal	Promedio
DGRMS 72 h (%)	43,45 ± 2,70	45,59 ± 1,80	44,520
S (h <sup>-1</sup> )	0,028 ± 0,02	0,027 ± 0,03	0,0275
L (h)	6,52 ± 1,90	6,63 ± 0,25	6,575
Vmáx (mL.g <sup>-1</sup> )	323,26 ± 21,64	310,36 ± 4,44	316,810
FR (g.kg <sup>-1</sup> )	131,08 ± 26,08	150,99 ± 2,30	141,035
FM (g.kg <sup>-1</sup> )	167,70 ± 19,07	142,01 ± 4,92	154,855
FL (g.kg <sup>-1</sup> )	476,93 ± 18,14	482,83 ± 49,80	479,880
FT (g.kg <sup>-1</sup> )	775,71 ± 49,98	753,02 ± 16,20	764,365

S: Tasa de fermentación, L: Fase de retardo, Vmáx: Volumen máximo de gas, FR: Fracción rápida, FM: Fracción media, FL: Fracción lenta, FT: Fracción Total, DGRMS: Degradación de la materia seca, ±: desviación estándar.

S: Fermentation rate, L: Lag phase, Vmax: Maximum gas volume, FR: Fast fraction, FM: Medium fraction, FL: Slow fraction, FT: Total fraction, DGRMS: Dry matter degradation, ±: standard deviation.

## Conclusiones

La extracción de líquido ruminal por cánula o sonda oro-ruminal no afecta los resultados obtenidos en la técnica de gas *in vitro*, por lo que podrían utilizarse indistintamente.

del estado de Chiapas, México, for the support provided in the call for the 2019 State System of Researchers.

### *End of English Version*

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación del estado de Chiapas, México, por el apoyo proporcionado en la convocatoria del Sistema Estatal de Investigadores 2019.

Luna, A.T., Piñeiro-Vázquez, S., Albores-Moreno, M.G., Pérez-Escobar y R. Castro-Chan. 2019. Fermentación ruminal y producción de metano usando la técnica de gas *in vitro* en forrajes de un sistema silvopastoril de ovinos de Chiapas, México. Rev. mex. de cienc. Pecuarias. 10(2): 298-314. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11242019000200298&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242019000200298&lng=es). <https://doi.org/10.22319/rmcop.v10i2.4529>

## Literatura citada

Jiménez-Santiago, Á., G., Jiménez-Ferrer, A., Alayón-Gamboa, E. J., Pérez-

Lourenco, J. M., T. R. Callaway, T. J. Kieran, T. C. Glenn, J. C. McCann, R. L. Stewart Jr. 2019. Analysis of the

- Rumen Microbiota of Beef Calves Supplemented During the Suckling Phase. *Front Microbiol.* 10:1131. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01131. PMID: 31191476; PMCID: PMC6547912.
- Martín, E., E. Pérez, S. Cañón, J. Rodríguez, y F. Rodríguez. 2005. Sonda Oro-Ruminal Experimental Como Alternativa Para La obtención De Microorganismos anaeróbicos Del Rumen. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 6(1) 39-42, DOI:10.21930/rcta.vol6\_num1\_art:34
- Menke, K., and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *LRRD.* 28:7-55.
- Miranda, L. A., L., Sandoval-González y R. Améndola- Massioti. 2015. Producción de gas como método para estimar *in vitro* la concentración de carbohidratos fermentables en rumen, en Congreso Asociación Latinoamericana de producción animal. [En línea]. Disponible en: <http://www.sochipa.cl/uploads/media/ALPA2015>. Fecha de consulta: julio de 2020.
- NRC National Research Council. 2007. Nutrient Requirements of small ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. The National Academies Press, Washington DC. 344 p.
- Official Methods of Analysis of the AOAC International, 2000. 17th edición. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, MD. USA.
- Pereira, P., F., Romão, E.M., Penzeti, J., Sanches, J. M., Curti, K., Flaiban y J.A., Lisboa. 2018. Importância da transfaunação no tratamento da acidose láctica ruminal aguda induzida em cabras e ovelhas. *Pesq. Vet. Bras.* 38(4): 670-678. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5051>
- Posada, S. L. y R.R. Noguera. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *LRRD.* 17 (4). Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>. Fecha de consulta: julio 2020.
- Ramírez-Díaz, R., R., Pinto-Ruiz, F., Medina-Jonapá y F. Guevara-Hernández. 2020. Efecto de inoculantes y aditivos sobre fracciones de fermentación ruminal y degradación *in vitro* en ensilajes de sorgo (*Sorghum* sp). *Ciencia UAT.* 15(1): 172-179. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v15i1.1332>
- Ramos-Morales, E., A. Arco-Pérez, A.I., Martín-García, D.R., Yáñez-Ruiz, P., Frutos y G. Hervás. 2014. Use of stomach tubing as an alternative to rumen cannulation to study ruminal fermentation and microbiota in sheep and goats. *Anim. Feed Sci. Tech.* 198: 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.09.016>
- Sandoval, L., L.A., Miranda, A., Lara, M., Huerta, M., Uribe y M., Martínez. 2016. Fermentación *in vitro* y la correlación del contenido nutricional de leucaena asociada con pasto estrella. *Rev. Mexicana cienc. agric.* 7(16): 3185-3196. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342016001203185&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342016001203185&lng=es&tlng=es)
- SAS Institute, Inc. 2011. SAS user's guide: Statistics, Version 9.6<sup>th</sup> Edition. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Schofield, P. and A.N. Pell. 1995. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. *J. Anim. Sci.* 73: 3455-3463. <https://doi.org/10.2527/1995.73113455x>
- Shen, J.S., Z. Chai., L. J. Song, J. X. Liu and Y. M. Wu. 2012. Insertion depth of oral stomach tubes may affect the fermentation parameters of ruminal fluid collected in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95 :5978-5984. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5499>
- Terré, M., L., Castells, F., Fàbregas and A., Bach. 2013. Short communication: Comparison of pH, volatile fatty acids, and microbiome of rumen

- samples from preweaned calves obtained via cannula or stomach tube. *J. Dairy Sci.* 96 :5290–5294. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5921>
- Udén, P., P., Robinson, G., Mateos and R., Blank. 2012. Use of replicates in statistical analyses in papers submitted for publication in *Animal Feed Science and Technology*. *Anim Feed Sci Tech.* 171(1): 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.10.008>
- Van Soest, P.J., J.B., Robertson and B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vargas-Bayona, J., G., Mejía-Porras, J., Bedoya-Mashuth, J.F., Gómez-Patiño. 2013. Estimación de la técnica *in vitro* de gases frente a otras técnicas de digestibilidad. *Spei Domus.* 9(18): 59-70. <https://doi.org/10.16925/sp.v9i18.547>
- Williams, B. A. 2000. Cumulative gas production techniques for forage evaluation. In D. I. Givens, E. Owen, R. F. E. Axford, & H. M. Omed (Eds.), *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition* (pp. 189-213). CABI Publishing Wallingford. <https://doi.org/10.1079/9780851993447.0189>



## Elaboration of carbonated beverages with sucralose from eggplant

Elaboración de bebida gaseosa con sucralosa a partir de jugo de berenjena

Produção de refrigerante com sucralose a partir de suco de beringela

Nelson Loyola Lopez, Carlos Acuña Carrasco, Leonardo Arenas Bravo and Mariela Arriola Herrera

Department of Agricultural Sciences. Faculty of Agricultural Sciences and Forestry. Maule Catholic University, 684, Carmen, Curicó, Chile. Email: (NL) [nloyola@ucm.cl](mailto:nloyola@ucm.cl); (CA) [cacunac@gmail.com](mailto:cacunac@gmail.com); (LA) [leagroarenas@gmail.com](mailto:leagroarenas@gmail.com); (MA) [marriola@ucm.cl](mailto:marriola@ucm.cl)

### Abstract

The eggplant (*Solanum melongena* L.) it is edible fruit plant, rich in vitamins, minerals and phenolic compounds, so its consumption brings health benefits. The objective of this work was to evaluate the quality nutritional, sensory and hygiene assessment of the beverage based on eggplant juice with CO<sub>2</sub> injection. This study had four treatments; Treatment T<sub>0</sub> Eggplant juice (330 mL), T<sub>1</sub> Eggplant juice (330 mL) + CO<sub>2</sub> (1,94 g) T<sub>2</sub> Eggplant juice (330 mL) + CO<sub>2</sub> (1,94 g) + Benzoate (1 g), T<sub>3</sub> Eggplant juice (330 mL) + CO<sub>2</sub> (1,94 g) + Sucralose (1 g). Evaluations were carried out at 24 hours, 30 and 60 days of storage (0°C and 95 % RH) and, at each of these moments, the acidity content, pH, reducing sugars, soluble solids and Vitamin C were determined. Sensorial evaluation measure were; color, flavor, texture, aroma and also acceptability and appearance. In regards to microbiological analysis, total coliforms were measured at 24 hours after the beverage was made. There was significant difference in the results of appearances between beverages elaborated with treatments T<sub>3</sub> in relation with T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> at 24 hours and 30 days of storage. Because of beverage with treatment T<sub>3</sub> had got better acceptability by the panelists, mainly at 30 days of storage. Therefore, beverages elaborated with treatments T<sub>0</sub> at 24 hours and 30 days of storage had lower appearance and acceptability. The vitamin C content showed a 25 mg (23

Received 23-07-2020 • Accepted 03-03-2021

\*Corresponding author. Email: [nelsonloyola@hotmail.com](mailto:nelsonloyola@hotmail.com)

mg standard) in the beverages elaborated with treatments  $T_3$ . The pasteurization process allowed the absence of total coliform in the beverages elaborated and also the good manufacture practices obtained an innocuous product to be consume.

**Keywords:** microbiological analysis, nutritional analysis, sensorial analysis, *Solanum melongena* L.

## Resumen

La berenjena (*Solanum melongena* L.) es una planta de fruto comestible, rico en vitaminas, minerales y compuestos fenólicos, por lo que su consumo aporta beneficios a la salud. El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad nutricional, sensorial e higiénica de una bebida a base de jugo de berenjena con inyección de  $CO_2$ . Se contempló cuatro (4) tratamientos; Tratamiento  $T_0$  jugo berenjena,  $T_1$  jugo berenjena (330 mL) +  $CO_2$  (1,94 g),  $T_2$  jugo berenjena (330 mL) +  $CO_2$  (1,94 g) + Benzoato (1 g),  $T_3$  jugo berenjena (330 mL) +  $CO_2$  (1,94 g) + Sucralosa (1 g). Se realizaron evaluaciones a las 24 horas, 30 y 60 días de almacenamiento ( $0^\circ C$  y 95 % HR), determinándose acidez, pH, azúcares reductores, sólidos solubles y vitamina C. Para el análisis sensorial se determinó: color, aroma, textura, sabor, aceptabilidad y apariencia. El análisis microbiológico incluyó coliformes totales a las 24 horas de elaborada la bebida. En la apariencia se observaron diferencias significativas entre las bebidas elaboradas el tratamiento  $T_3$  versus los tratamientos  $T_0$ ,  $T_1$  y  $T_2$ , a las 24 horas y 30 días de almacenamiento, debido a que las bebidas elaboradas con el tratamiento  $T_3$ , fueron en la mayoría de las respuesta de los panelistas, las que lograron una mayor aceptabilidad, particularmente a los 30 días de almacenamiento, mientras que las bebidas elaboradas con el tratamiento  $T_0$ , a las 24 horas y 30 días de almacenamiento obtuvieron una menor calificación, tanto en apariencia como aceptabilidad. El contenido de vitamina C, se mantuvo cercano a 25 mg (23 mg estándar), en las bebidas elaboradas con el tratamiento  $T_3$ . La ausencia de coliformes totales se debió a la pasteurización de las bebidas y a la aplicación de buenas prácticas de manufactura, obteniendo un producto inocuo para su consumo.

**Palabras clave:** análisis microbiológico, análisis nutricional, análisis sensorial, *Solanum melongena* L.

## Resumo

A planta do ovo (*Solanum melongena* L.) é uma planta frutífera comestível, rica em vitaminas, minerais e compostos fenólicos, de modo que seu consumo proporciona benefícios à saúde. O objetivo deste trabalho era avaliar a qualidade nutricional, sensorial e higiênica de uma bebida à base de suco de berinjela com injeção de  $CO_2$ . Foram considerados quatro (4) tratamentos; Tratamento  $T_0$  suco de berinjela,  $T_1$  suco de berinjela (330 mL) +  $CO_2$  (1,94 g),  $T_2$  suco de berinjela (330 mL) +  $CO_2$  (1,94 g) + Benzoato (1 g),  $T_3$  suco de berinjela (330 mL) +  $CO_2$  (1,94

g) + Sucralose (1 g). As avaliações foram realizadas em 24 horas, 30 e 60 dias de armazenamento (0°C e 95 % RH), determinando acidez, pH, açúcares redutores, sólidos solúveis e vitamina C. Para análise sensorial, foram determinadas a cor, o aroma, a textura, o sabor, a aceitabilidade e a aparência. A análise microbiológica incluiu coliformes totais 24 horas depois que a bebida foi feita. Na aparência, foram observadas diferenças significativas entre as bebidas elaboradas com o tratamento T<sub>3</sub> versus os tratamentos T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>, às 24 horas e 30 dias de armazenamento, pois as bebidas elaboradas com o tratamento T<sub>3</sub> foram, na maioria das respostas dos painelistas, as que obtiveram uma maior aceitabilidade, particularmente aos 30 dias de armazenamento, enquanto as bebidas elaboradas com o tratamento T<sub>0</sub>, às 24 horas e 30 dias de armazenamento, obtiveram uma menor qualificação, tanto na aparência quanto na aceitabilidade. O teor de vitamina C permaneceu próximo a 25 mg (23 mg padrão) em bebidas feitas com o tratamento T<sub>3</sub>. A ausência de coliformes totais se devia à pasteurização das bebidas e à aplicação de boas práticas de fabricação, obtendo um produto seguro para o consumo.

**Palavras-chave:** análise microbiológica, análise nutricional, análise sensorial, *Solanum melongena* L.

## Introduction

The eggplant (*Solanum melongena* L.) is originally from India and it has been cropped approximately since 1200 AD (Mainali, 2014). The eggplant fruit is a fleshy berry of oblong or oval shape, which presents varied colors, with predominant purple and bright black colors with green chalice (Milleo *et al.*, 2011). It has a great quantity of ascorbic acid and phenolic compounds, deserving a high antioxidant power, being able to be used in professional or therapeutic medicine as well as in the elaboration of various processed products (Heras *et al.*, 2013).

It is necessary to develop an agro-industrial alternative to give this vegetable a bigger impulse and an additional value, so as to try to obtain a benefit in each of the consumer health, who are currently inserted in a culture where everything deals with

## Introducción

La berenjena (*Solanum melongena* L.) es originalmente de la India, y ha sido cultivada aproximadamente desde 1200 AD (Mainali, 2014). La fruta de berenjena es una baya carnosa de forma oblonga u ovalada, la cual presenta colores variados, como púrpura y negro intenso predominante con cálices verdes (Milleo *et al.*, 2011). Tiene una gran cantidad de ácido ascórbico con compuestos fenólicos, otorgándole un alto poder antioxidante pudiendo utilizarse en la medicina profesional o terapéutica, así como en la elaboración de diversos productos procesados (Heras *et al.*, 2013).

Es necesario desarrollar una alternativa agroindustrial para darle a este vegetal un mayor impulso y un valor adicional para tratar de obtener un beneficio en la salud de cada uno de los consumidores, que actualmente

the supply of harmful and unhealthy artificial food. The present study aims at evaluating the eggplant to be subjected, at first, to a treatment of extraction of its pulp and its subsequent grinding to obtain the maximum juice from the fruit and then finally to make a non-alcoholic soft beverage. As a hypothesis, it is suggested that the addition of CO<sub>2</sub> in eggplant juice would enable a refreshing carbonated drink to be obtained with good sensorial acceptability, nutritional support and safety.

## Materials and methods

The research was carried out in the science laboratory belonging to the Catholic University of Maule, San Isidro Campus, located in Los Niches sector at 6 km to the west of the city of Curicó and the location coordinates are South Latitude 35°5'35.8002" and West Longitude 71°8'1.9998" (Santibáñez and Uribe, 1993).

The eggplants (*Solanum melongena* L.) selected belong to the Blacknite variety, according to the physiological maturity indexes used for eggplants in terms of human consumption were soluble solids content, color and pH.

### Investigation methodology.

The necessary methodology for the research is represented in the following flow line (figure 1).

Tratamiento T<sub>0</sub> Jugo de berenjena, T<sub>1</sub> Jugo de berenjena + CO<sub>2</sub>, T<sub>2</sub> Jugo de berenjena + CO<sub>2</sub> + Benzoato, T<sub>3</sub> Jugo de berenjena + CO<sub>2</sub> + Sucralosa.

### Description of treatments.

There was one control treatment and

están insertos en una cultura donde todo gira en torno a la oferta de alimentos artificiales nocivos y poco saludables. El presente estudio tiene como objetivo evaluar la berenjena para someterla en un primer momento a un tratamiento de extracción de su pulpa, y su posterior trituración para obtener el máximo zumo del fruto y finalmente, elaborar una bebida refrescante sin alcohol. Como una hipótesis, se sugiere que la adición de CO<sub>2</sub> en el jugo de berenjena permitiría obtener una bebida carbonatada refrescante con buena aceptabilidad sensorial, soporte nutricional y seguridad.

## Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de ciencia correspondiente a la Universidad Católica de Maule, Campus de San Isidro, localizado en el sector Los Niches a 6 km al oeste de la Ciudad de Curicó y las coordenadas de ubicación son Latitud Sur 35°5'35,8002" y Longitud Oeste 71°8'1,9998" (Santibáñez y Uribe, 1993).

Las berenjenas (*Solanum melongena* L.) seleccionadas correspondieron a la variedad Blacknite, de acuerdo a los índices de madurez fisiológica utilizados para las berenjenas en términos de consumo humano fueron el contenido de sólidos solubles, el color y el pH.

### Metodología de la investigación

La metodología necesaria para esta investigación es representada en la siguiente línea de flujo (figura 1).

### Descripción de los tratamientos.

Hubo un tratamiento de control y tres

three different treatments called  $T_1$ ,  $T_2$  and  $T_3$ .

Treatment  $T_0$ : Eggplant juice (330 mL) without  $CO_2$  injection.

Treatment  $T_1$ : Eggplant juice with  $CO_2$  (1.94 g) injection.

Treatment  $T_2$ : Eggplant juice with  $CO_2$  (1.94 g) injection + Sodium benzoate (1 g).

Treatment  $T_3$ : Eggplant juice with  $CO_2$  (1.94 g) injection + Sodium benzoate (1 g) + Sucralose (1 g).

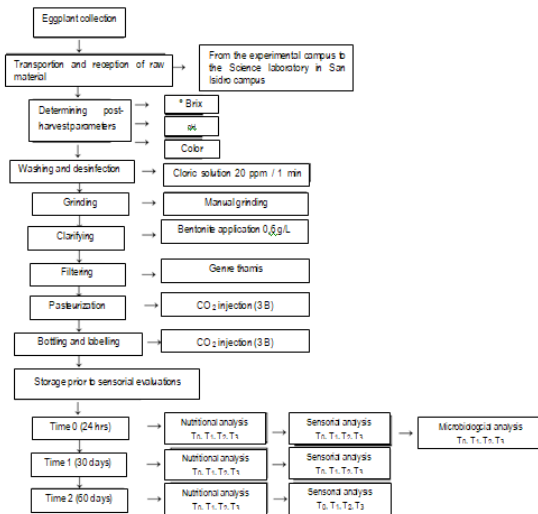
tratamientos diferentes denominados  $T_1$ ,  $T_2$  y  $T_3$ .

Tratamiento  $T_0$ : Jugo de berenjena (330 mL) sin inyección de  $CO_2$ .

Tratamiento  $T_1$ : Jugo de berenjena con inyección de  $CO_2$  (1,94 g).

Tratamiento  $T_2$ : Jugo de berenjena con inyección de  $CO_2$  (1.94 g) + Benzoato de sodio (1 g).

Tratamiento  $T_3$ : Jugo de berenjena con inyección de  $CO_2$  (1.94 g) + Benzoato de sodio (1 g) + Sucralosa (1 g).



**Figure 1. Diagram of the production of eggplant beverage with the treatments.** Treatment  $T_0$  Eggplant juice,  $T_1$  Eggplant juice +  $CO_2$ ,  $T_2$  Eggplant juice +  $CO_2$  + Benzoate,  $T_3$  Eggplant juice +  $CO_2$  + Sucralose.

**Figura 1. Diagrama de producción de la bebida de berenjena con los tratamientos.** Tratamiento  $T_0$  Jugo de berenjena,  $T_1$  Jugo de berenjena +  $CO_2$ ,  $T_2$  Jugo de berenjena +  $CO_2$  + Benzoato,  $T_3$  Jugo de berenjena +  $CO_2$  + Sucralosa.

**Soluble solids.** This procedure was carried out with an Atago refractometer ATC-1 (A.O.A.C, 1990).

**Solidos solubles.** Este procedimiento se llevó a cabo con un refractómetro Atago ATC-1 (A.O.A.C, 1990).

**Determination of pH.** A Hanna pH-meter HI8424 was used to determinate pH, buffer 4.0, buffer 7.0 (Madrid, 1994).

**Determination of Color.** Panelist were considered to perceive the color. They received three samples of extracted fruits and then to select only one, according to an scale from letter A to letter F, noticing an increase in the intensity of this attribute by using the proposed method by Munsell (1994). Panelists marked with an X, the letter that was considered to be the best to represent the color of each eggplant. Primer adapted for the evaluation of post-harvest color of eggplant (*Solanum melongena* L.) belonging to the blacknite variety.

**Washing, disinfection.** It was used water with chlorine at a dose of 20 ppm for one minute, according to Garmendia and Vero (2006).

**Grinding.** The grinding process was carried out with a high speed spinning mill (Madrid *et al.*, 1997).

**Clarification and filtering.** In this case, having a total of 40 L, it was necessary to hydrate 24 g of bentonite in a solution of 240 mL and after 24 hours the liquid was filtered and passed through a cloth and then the clarifier was kept for 24 hours.

**Addition of preservative and sweetener.** The addition of sodium benzoate was performed for beverages made in treatments T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub>, while the addition of sucralose diluted in about 50 mL of hot water was only performed for beverages made in treatment T<sub>3</sub>.

**Pasteurization.** The pasteurization process was carried out at a temperature of 85 °C for 12 min in a 40 L stainless steel pot (Sánchez *et al.*, 2012).

**Determinación del pH.** Un medidor de pH Hanna HI8424 fue utilizado para determinar el pH, tampón 4.0, tampón 7.0 (Madrid, 1994).

**Determinación del color.** Se consideraron panelistas para percibir el color. Ellos recibieron tres muestras de frutas extraídas y luego seleccionaron una sola de acuerdo a una escala a partir de la letra A hasta la letra F, notándose un incremento en la intensidad de este atributo, mediante el uso del método propuesto por Munsell (1994). Los panelistas marcaron con una X la letra que fue considerada mejor para representar el color de cada berenjena. Se adaptó una cartilla para la evaluación del color en la post-cosecha de berenjena (*Solanum melongena* L.) correspondiente a la variedad blacknite.

**Desinfección por lavado.** Se utilizó agua con cloro a una dosis de 20 ppm durante un minuto, de acuerdo a Garmendia y Vero (2006).

**El proceso de molido.** Se llevó a cabo con un molino de hilatura de alta velocidad (Madrid *et al.*, 1997).

**Clarificación y filtrado.** En este caso, teniendo un total de 40 L, fue necesario hidratar 24 g de bentonita en una solución de 240 mL y después de 24 horas el líquido se filtró y pasó a través de tela y luego se mantuvo el clarificado durante 24 horas.

**Adición de conservante y edulcorante.** La adición de benzoato de sodio se llevó a cabo para las bebidas realizadas en los tratamientos T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>, mientras la adición de sucralosa diluida en 50 mL de agua caliente fue realizada para las bebidas del tratamiento T<sub>3</sub>.

**Stillness.** The juice stayed for 30 minutes at room temperature in order to achieve the stability of the product.

**Bottling and gasification.** Packaging was done in 330 mL glass bottles, sterilized and washed with peracetic acid. The CO<sub>2</sub> was applied from stainless steel gallon (12 %) at a pressure of 3 bars, leaving a space of 2 cm free in the neck of the bottles.

**Labeling.** Two labels were designed, one of them included contents of liquid, flavor, while the other with the nutritional information, expiration date and optimal storage conditions (Madrid *et al.*, 1997).

**Storage.** The product was carried out at a temperature of 5 to 7 °C and 95 % humidity. The first analysis was done 24 hours after the product was produced, the second and third analysis were 30 and 60 days. The panelists tested the samples at ambient temperature.

**Microbiological test.** The analysis of total coliforms was made at the first 24 hours after the production of the beverage (Instituto de Salud Pública de Chile, 2008). It was sent samples of 330 mL of beverages with their respective treatments to the laboratory Quality lab, in which total coliforms were analyzed, using lactose hydrolysis as methodology (Feng *et al.*, 2013).

**Sensorial analysis.** The room used for each of the sensorial evaluations consisted of 12 individual booths, properly illuminated and equipped (Hernández, 2005).

**Methodology of sensorial analysis.** It was determined by the evaluation of 13 trained panelists. Each panelist was assigned a booth and was presented 12 samples of

**Pasteurización.** El proceso de pasteurización se llevó a cabo a una temperatura de 85°C durante 12 min en 40 L en olla de acero inoxidable

**Proceso de reposo.** El jugo se reposó durante 30 minutos en temperatura ambiente con el fin de lograr la estabilidad del producto.

**Embotellado y gasificación.** El envasado se hizo en botellas de vidrio de 330 mL, esterilizadas y lavadas con ácido peracético. El CO<sub>2</sub> se aplicó desde un galón de acero inoxidable (12%) a una presión de 3 bares, dejando un espacio libre de 2 cm en el cuello de las botellas.

**Etiquetado.** Se diseñaron dos etiquetas, una de ellas con el contenido del líquido y de sabor, mientras que la otra con la información nutricional, la fecha de caducidad y las condiciones óptimas de almacenamiento (Madrid *et al.*, 1997).

**Almacenamiento.** El producto se almacenó a una temperatura de 5 a 7°C y con 95% de humedad. El primer análisis fue hecho 24 horas después de elaborado el producto, el segundo y el tercer análisis se realizó a los 30 y 60 días. Los panelistas evaluaron las muestras a temperatura ambiente.

**Prueba microbiológica.** El análisis de los coliformes totales fue realizado durante las primeras 24 horas después de la producción de la bebida (Instituto de Salud Pública de Chile, 2008). Se enviaron muestras de bebidas de 330 mL con sus respectivos tratamientos al laboratorio Quality Lab, en el cual los coliformes totales fueron analizados utilizando una hidrólisis de lactosa como metodología (Feng *et al.*, 2013).



a small glass of 20 mL and also a color chart adapted for sensorial evaluation, corresponding to the four treatments with their corresponding three repetitions (Witting, 2001).

### Nutritional analysis

**Determination of acidity.** It was determined the total or titratable amount of the predominant acid, which was achieved by the addition of a standard alkaline solution according to AOAC (1990). After obtaining a pH of +/- 8.1, the data was recorded and expressed in the following formula:

% acid :

$$\frac{V \times N \times F \times 100}{M}$$

where: V: NaOH volume F: predominant acid. N: NaOH normality (0.1). M: grams of sample (AOAC 1990).

**Determination of pH.** This parameter was determined jointly and parallel to the acidity analysis according to (AOAC, 1990).

**Determination of Vitamin C.** This method is based on oxide-reduction volumetric reaction, as the ascorbic acid (vitamin C) is oxidized to dehidroascorbic acid, a reaction with 2,6-dichlorophenolindophenol (DFI) which is reduced by a redox reaction to a colourless solution. The values are reported in mg vit C.100 mL<sup>-1</sup> (AOAC, 1990). A color change was observed and the spent volume of juice was recorded to be used in the following formula:

Vitamin C (mg vit C.100 mL<sup>-1</sup>) = 8 x volume spent in standardization

Volume spent juice diluted x °Brix diluted juice (AOAC, 1990).

**Determination of reducing sugars.** Cupric sulfate was reacted with reducing sugar in an alkaline

**Análisis sensorial.** El cuarto utilizado para cada evaluación sensorial consistía en 12 cabinas individuales, debidamente iluminadas y equipadas (Hernández, 2005).

**Metodología del análisis sensorial.** Se determinó mediante la evaluación de 13 panelistas entrenados. A cada panelista se le asignó una cabina y se le presentaron 12 muestras en un vaso pequeño de vidrio de 20 mL, y también una carta de colores adaptada para la evaluación sensorial, correspondiente a los cuatro tratamientos con sus correspondientes tres repeticiones (Witting, 2001).

### Análisis nutricional

**Determinación de acidez.** Se determinó la cantidad total titulable del ácido predominante, el cual se logró por la adición de una solución alcalina estándar de acuerdo a AOAC (1990). Luego de obtener un pH de +/- 8,1, los datos fueron registrados y expresados en la siguiente formula:

% acid :

$$\frac{V \times N \times F \times 100}{M}$$

Dónde: V: volumen de NaOH F: ácido predominante. N: normalidad del NaOH (0,1). M: gramos de muestra (AOAC, 1990).

**Determinación del pH.** Este parámetro fue determinado conjuntamente y paralelamente al análisis de acidez según (AOAC, 1990).

**Determinación de la vitamina C.** Este método está basado en la reacción volumétrica de óxido-reducción, el ácido ascórbico (vitamina C) se oxida a ácido deshidroascórbico, reacciona con el 2,6-diclorofenolindofenol (DFI), el cual es reducido por reacción redox

medium, forming cupric oxide, which formed a red brick-like precipitate (AOAC, 1990). The calculation of reducing sugars was determined by the following formula:

% reducing sugars :

$$\frac{V1 \times F \times 100}{Wm \times G}$$

where: V1: total volume. F: fehling factor (0.041). Wm: sample weight. G: expenditure of the solution (AOAC, 1990).

#### **Determination of soluble solids.**

The determination of soluble solids was carried out using the metric refractive method (AOAC, 1990; Madrid, 1994).

**Experimental design for the elaboration of eggplant carbonated beverages.** A completely block design (DBCA) at random was used, with four treatments and three repetitions, i.e., 12 trials, in which the treatments were randomly and consistently assigned so as not to influence on the results (table 1).

**Experimental design of sensorial evaluation.** A completely at random design block (DBCA) was performed, with four treatments and 13 repetitions, being the experimental unit 330 mL of eggplant beverage contained in a glass bottle. The repetitions belonged to the 13 evaluators of the sensorial panel. The data obtained in the nutritional and chemical tests from three samples and three replications were analyzed with a confidential level of 95 %. In cases where significant differences were found, they were submitted to the Tukey test with a significance level of p equal of 0.05. Data were analyzed with the statistical program IBM-SPSS.

a una solución incolora. Los valores son reportados en mg vit C.100 mL<sup>-1</sup> (AOAC, 1990). Un cambio en el color fue observado y se registró el volumen de jugo gastado para utilizarlo en la siguiente fórmula:

Vitamina C (mg vit C.100 mL<sup>-1</sup>) = 8 x volumen gastado en la estandarización

Volumen gastado de jugo diluido x °Brix jugo diluido (AOAC, 1990).

**Determinación de los azúcares reductores.** El sulfato cúprico reaccionó con el azúcar reductor en un medio alcalino, formando óxido cúprico, el cual formó un precipitado rojo ladrillo (AOAC, 1990). El cálculo de los azúcares reductores se determinó mediante la siguiente fórmula:

% Azúcares reductores:

$$\frac{V1 \times F \times 100}{Wm \times G}$$

Dónde: V1: volumen total. F: factor fehling (0,041). Wm: peso de la muestra. G: gasto de la solución (AOAC, 1990).

**Determinación de sólidos solubles.** La determinación de sólidos solubles se llevó a cabo utilizando el método de refracción métrica (AOAC, 1990; Madrid, 1994).

**Diseño experimental para la elaboración de bebidas gaseosas de berenjena.** Se utilizó un diseño de bloques completamente (DBCA) al azar, con cuatro tratamientos y tres repeticiones, es decir, 12 ensayos, en los que los tratamientos se asignaron de forma aleatoria y coherente para no influir en los resultados (cuadro 1).

**Diseño experimental y evaluación sensorial.** Un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) se realizó, con cuatro

**Table 1. Statistical design of the elaboration of eggplant carbonated beverages.****Cuadro 1. Diseño estadístico de la elaboración de bebidas gaseosas de berenjena.**

Eggplant juice (Treatment T <sub>0</sub> )	Eggplant juice + CO <sub>2</sub> (Treatment T <sub>1</sub> )	Eggplant juice + CO <sub>2</sub> + benzoate (Treatment T <sub>2</sub> )	Eggplant juice + CO <sub>2</sub> + benzoate + Sucralose (Treatment T <sub>3</sub> )
T <sub>0</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>2</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>3</sub> R <sub>1</sub>
T <sub>0</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>3</sub> R <sub>2</sub>
T <sub>0</sub> R <sub>3</sub>	T <sub>1</sub> R <sub>3</sub>	T <sub>2</sub> R <sub>3</sub>	T <sub>3</sub> R <sub>3</sub>

## Results and discussion

### Evaluation of post-harvest fruit parameters

The harvest of the eggplants fruits was with the ranged from 4.2° to 4.6 °Brix and an average of 4.3 °Brix, these results were consistent with those reported by authors such as Heras *et al.* (2013), who indicate that the fruits of mature eggplant have a content of  $4.39 \pm 0.06$  °Brix.

The pH results obtained was in the ranged from 5.5 to 5.64, with an average pH of 5.57; a similar result have been found by authors such as Heras *et al.* (2013), according to them, mature eggplant have a  $5.59 \pm 0.05$  of pH.

The values obtained with the color chart carried out showed that there was between “E” and “F” tones, which were granted marks “6” and “7” respectively to better interpret the data. These colors, according to Munsell. (1994), correspond to “bluish black”, represented by number “6” and “dark black”, represented by number “7”. The predominant color was between dark purple and black

tratamientos y 13 repeticiones, siendo la unidad experimental 330 mL de bebida de berenjena contenida en una botella de vidrio. Las repeticiones correspondieron a los 13 evaluadores del panel sensorial. Los datos obtenidos en las pruebas nutricionales y químicas de tres muestras y tres repeticiones fueron analizadas con un nivel confidencial de 95%. En los casos donde se encontraron diferencias significativas, se sometieron a la prueba de Tukey con un nivel de significación de p igual a 0,05. Los datos se analizaron con el programa estadístico IBM-SPSS.

## Resultados y discusión

### Evaluación de los parámetros post-cosecha de la fruta

La cosecha de los frutos de berenjena fue con el rango de 4,2° a 4,6 °Brix y un promedio de 4,3 °Brix, estos resultados fueron consistentes con los reportados por autores como Heras *et al.* (2013), quienes indican que los frutos de berenjena madura tienen un contenido de  $4,39 \pm 0,06$  °Brix.

which, according to Sancho *et al.* (1999), belongs to chromatic colors. In addition, consumers expect foods to have a certain color, otherwise they will judge it as a quality defect (Vaclavik, 2002).

### Evaluation of nutritional parameters

**Acidity.** In figure 2 different acidity percentages can be observed, where a considerable increase in the measurement of this parameter was observed in treatments where CO<sub>2</sub> was added, i.e., beverages made in treatments T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> (0.20 % of citric acid at 30 and 60 days of storage, their values were the same; in contrast with the ones made in treatment T<sub>0</sub>, (at 30 and 60 days of storage, their values were the same and lower) where CO<sub>2</sub> was not added. Which evidences in treatments T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> were not statistically different ( $p < 0.05$ ) from each other, but with the drinks made T<sub>0</sub>.

It is important to highlight that beverages made in treatment T<sub>3</sub>, (shown after 24 hours and 30 days of storage), the addition of sucralose favored a little reduction of the acidity content because such ingredient contains neither soluble solids nor pH, but it has a sweetening power. According to the statistical analysis, it can be mentioned that among the different treatments there were significant differences, although it should be emphasized that at 60 days of storage, this difference was smaller, since beverages made in T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub>, did not present significant differences among them, being only statistically different to beverages made in treatment T<sub>0</sub>.

Los resultados de pH obtenidos fueron de un rango de 5,5 a 5,64, con pH promedio de 5,57; un resultado similar fue encontrado por autores como Heras *et al.* (2013), de acuerdo a ellos la berenjena madura tiene un pH de  $5,59 \pm 0,05$ .

Los valores obtenidos con la carta de colores mostraron que había entre los tonos “E” y “F”, a los que se les concedieron las marcas “6” y “7”, respectivamente para interpretar mejor los datos. Estos colores, según Munsell (1994), corresponden al “negro azulado”, representado por el número “6” y al “negro oscuro”, representado por el número “7”. El color predominante estaba entre el morado oscuro y el negro que según Sancho *et al.* (1999), pertenece a los colores cromáticos. Además, los consumidores esperan que los alimentos tengan un color determinado, pues de lo contrario lo juzgarán como un defecto de calidad (Vaclavik, 2002).

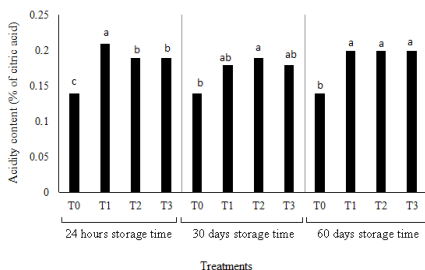
### Evaluación de los parámetros nutricionales

**Acidez.** En la figura 2 se pueden observar diferentes porcentajes de acidez, donde se observó un aumento considerable en la medición de este parámetro en los tratamientos donde se adicionó CO<sub>2</sub>, es decir, las bebidas elaboradas en los tratamientos T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> (0,20% de ácido cítrico a los 30 y 60 días de almacenamiento, sus valores fueron iguales); en contraste con las elaboradas en el tratamiento T<sub>0</sub> (a los 30 y 60 días de almacenamiento, sus valores fueron iguales y menores) donde no se adicionó CO<sub>2</sub>. Lo cual evidencia que los tratamientos T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> no fueron estadísticamente

According to Heras *et al.* (2013), the acidity content, expressed in percentage (%) of citric acid in eggplant juice, without any additive is  $0.14 \pm 0.02$ , which is similar to the data obtained and expressed in figure 2. It can be inferred that the increase showed by beverages from treatments  $T_1$ ,  $T_2$  and  $T_3$  is due to the action exerted by  $CO_2$  addition and the application of sodium benzoate, because these additives, as they are encharged of avoiding the deterioration of the drink cause an increase in the acidity content to avoid bacterial and fungal development. However, Zapata (2011), explained there are acidity regulators allowed in the manufacture of beverages, that is, ascorbic acid and phosphoric acid, which are characterized as additives,

diferentes ( $p < 0,05$ ) entre sí, pero sí con las bebidas realizadas  $T_0$ .

Es importante destacar que las bebidas hechas en el tratamiento  $T_3$ , (se muestran después de 24 horas y 30 días de almacenamiento), la adición de sucralosa favoreció una pequeña reducción del contenido de acidez, ya que este ingrediente no contiene sólidos solubles ni pH, pero tiene un poder edulcorante. De acuerdo al análisis estadístico, puede mencionarse que entre los diferentes tratamientos existieron diferencias significativas, aunque debería enfatizarse que a los 60 días de almacenamiento la diferencia fue más pequeña, mientras que las bebidas hechas en  $T_1$ ,  $T_2$  y  $T_3$ , no presentaron diferencias significativas entre ellas, siendo una sola diferente estadísticamente a las bebidas hechas en el tratamiento  $T_0$ .



**Figure 2. Average values of acidity content from beverages elaborated with three treatments measured in three time of storage period.** Different letters show significant statistical differences ( $p \leq 0.05$ ) in the acidity content (% of citric acid).

**Figura 2. Valores promedio del contenido de acidez de bebidas elaboradas con tres tratamientos, medidos en tres tiempos de periodos de almacenamiento** Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0,05$ ) en el contenido de acidez (% de ácido cítrico).

whose maximum limit are estimated by good manufacturing practices. According to López and Cerezo (2008),

De acuerdo a Heras *et al.* (2013), el contenido de acidez expresado en porcentaje (%) de ácido cítrico en el

carbonated beverages contain carbonic acid, formed by carbon dioxide and when the gas is spread, pH remains acidic, indicating that the beverages have their inherent acidity.

**pH.** The amount of pH contained were from 5.5 to 5.64 with an average of 5.7 in the beverages with their respective treatment  $T_0$ ,  $T_2$  and  $T_3$ , were higher than beverages made in treatment  $T_1$  (data not shown). Fuentes (2008), exhibited the average pH of soft beverages sold in Chile varies between 2.8 and 3.6, contrasting with the values obtained in this test, which can be granted to the fact that the temperature used in both trials to evaluate pH was not similar in the evaluation in soft drinks. Fuentes (2008), used a temperature of 5 °C, while for pH measurement in the eggplant beverage, an environmental temperature of 20 °C was used.

In addition to the results, pH obtained in the harvest period were between 5.5 to 5.6 with an average of 5.57 which is in agreement with Heras *et al.* (2013) who explained that egg fruits in ripe condition has a pH of 5.59  $\pm$  0.05 (even data not shown). In spite of, following the drop in the pH content generated in beverages made in  $T_1$  treatment is caused by the preservative added to  $T_2$  (sodium benzoate), and the reason is that, although the sodium benzoate is neutral, it produces an increase of solids, fulfilling its preservative function, only up to a value of pH 5 (Baltes, 2006).

**Reducing sugars.** In figure 3, according to the results it can be indicated that beverages made in treatment  $T_0$  obtained a higher

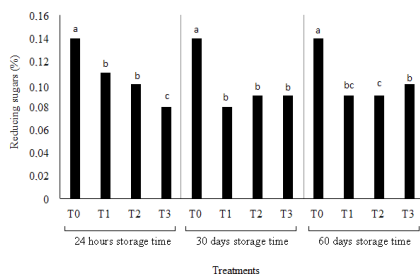
jugo de berenjena sin ningún aditivo fue de  $0,14 \pm 0,02$ , el cual es similar a los datos obtenidos y expresados en la figura 2. Se puede deducir que el aumento mostrado por las bebidas de los tratamientos  $T_1$ ,  $T_2$  y  $T_3$  se deba a la acción ejercida por la adición de  $CO_2$  y la aplicación de benzoato de sodio, ya que estos aditivos al estar encargados de evitar el deterioro de la bebida provocan un aumento del contenido de acidez para evitar el desarrollo bacteriano y fúngico. Sin embargo, Zapata (2011), explicó que existen reguladores de la acidez permitidos en la fabricación de bebidas, los cuales son ácido ascórbico y ácido fosfórico, que se caracterizan por ser aditivos, donde su límite máximo es estimado por las buenas prácticas de fabricación. De acuerdo a López y Cerezo (2008), las bebidas gaseosas contienen ácido carbónico, formados por dióxido de carbono y cuando el gas se extiende, el pH sigue siendo ácido, indicando que las bebidas tienen su acidez inherente.

**pH.** El valor del pH fue de 5,5 a 5,64 con un promedio de 5,7, en las bebidas de los tratamientos  $T_0$ ,  $T_2$  y  $T_3$ , y fue más alto que en las bebidas del tratamiento  $T_1$  (datos no mostrados). Fuentes (2008), mostró que el promedio de pH de las bebidas no alcohólicas vendidas en Chile varía entre 2,8 y 3,6, contrastando con los valores obtenidos en esta prueba, lo que puede otorgarse al hecho de que la temperatura utilizada en ambos ensayos para evaluar el pH no fue similar en la evaluación de bebidas no alcohólicas. Fuentes (2008), utilizó una temperatura de 5 °C, mientras que para la medición del pH en la

average percentage of this parameter with a value of 0.14 %, while beverages made in treatment  $T_3$ , obtained a lower average percentage of reducing sugars with a value of 0.08 % during the 24 hours of storage.

bebida de berenjena, se utilizó una temperatura ambiental de 20 °C.

Además de los resultados, el pH obtenido en el periodo de cosecha fue entre 5,5 a 5,6 con un promedio de 5,57 lo cual está de acuerdo con Heras



**Figure 3.** Average values of reducing sugars (%) from beverages elaborated with three treatments measured in three time of storage period. Different letters show significant statistical differences ( $p \leq 0.05$ ) in reducing sugars (% by treatment in their storage time).

**Figura 3.** Valores promedio de azúcares reductores (%) de bebidas elaboradas con tres tratamientos medidos en tres tiempos de periodos de almacenamiento. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0,05$ ) en azúcares reductores (% por el tratamiento en su tiempo de almacenamiento).

According to the statistical study, it was possible to indicate that among the different treatments there were significant differences, the latter being less visible at 30 days of storage, in which beverages made in treatments  $T_1$ ,  $T_2$  and  $T_3$  did not show statistically significant differences between them, but their were significant difference with reducing sugar in treatment  $T_0$ .

According to Madrid (1994), the difference between each repetition of a sample when being developed by the same analyst should not be bigger than 0.02 g per 100  $g^{-1}$  of sample. In this way

*et al.* (2013) quienes explicaron que los frutos de la planta de berenjena en estado de madurez tienen un pH de 5,59 + \ - 0,5 (Datos no mostrados aún). A pesar del descenso en el contenido de pH generado en las bebidas elaboradas en el tratamiento  $T_1$ , en  $T_2$  fue causado por el conservante añadido (benzoato de sodio), y la razón es que, aunque el benzoato de sodio es neutro, produce un aumento de los sólidos, cumpliendo su función conservadora sólo hasta un valor de pH 5 (Baltes, 2006).

**Azúcares reductores.** En la figura 3, de acuerdo a los resultados



the data obtained, this principle was fulfilled in all treatments, except for beverages made in treatment  $T_1$  after 24 hours and also 30 days of storage. Therefore, it is necessary to considered that the low amounts of reducing sugars naturally present in the fruit may be diluted by other components which decrease the percentage of reducing sugars. According to Ortiz and Vera (2013), it is indicated that the average content of reducing sugars in carbonated beverages is 2.42 g of sugar, obtained from 10.7 g of total sugars, being still a matter of discussion, because many times in the labeling of the drinks, such content of reducing sugars is lower, causing a mistake in the consumers, at the moment of choosing which beverage to drink.

**Vitamin C.** The values expressed in figure 4 show that beverages made in treatments  $T_1$  and  $T_3$  were able to obtain a higher content of vitamin C, while beverages made in treatment  $T_0$  had a lower average content of this parameter. The higher value of vitamin C obtained by the beverages made in treatments  $T_1$  and  $T_3$ , that have  $CO_2$  addition, compared to treatment  $T_0$ , that is only juice, the authors considered that it is possible to due to the reaction of carbon dioxide always tends to acidify the samples and, in this case, it increases the content of vitamin C.

According to the statistical data, it can be mentioned that among the different treatments there were statistically significant differences, which contrasts with what was shown in figure 4, since at 30 days

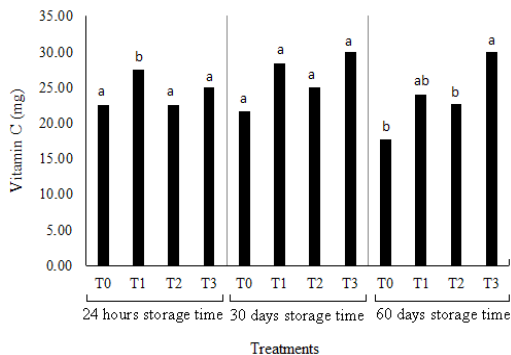
se puede indicar que las bebidas realizadas en el tratamiento  $T_0$  obtuvieron el porcentaje promedio más alto de este parámetro con un valor de 0,14%, mientras que en las bebidas realizadas en el tratamiento  $T_3$ , se obtuvo un porcentaje promedio más bajo de azúcares reductores con un valor de 0,08% durante las 24 horas de almacenamiento.

De acuerdo al estudio estadístico fue posible indicar que entre los diferentes tratamientos existieron diferencias significativas, siendo esta última menos visible a los 30 días de almacenamiento en los que las bebidas elaboradas en los tratamientos  $T_1$ ,  $T_2$  y  $T_3$  no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas, pero fueron significativamente diferentes con los azúcares reductores en el tratamiento  $T_0$ .

De acuerdo a Madrid (1994), la diferencia entre cada repetición de cada muestra al ser desarrollada por el mismo analista, debería no ser mayor que 0,02 g por 100 g<sup>-1</sup> de muestra. De acuerdo con los datos obtenidos, este principio se cumplió en todos los tratamientos, excepto en las bebidas elaboradas en el tratamiento  $T_1$  después de 24 horas y también de 30 días de almacenamiento. Por lo tanto, es necesario considerar que las bajas cantidades de azúcares reductores presentes naturalmente en la fruta pueden ser diluidas por otros componentes que disminuyen el porcentaje de azúcares reductores. Según Ortiz y Vera (2013), se indica que el contenido medio de azúcares reductores en las bebidas gaseosas es de 2,42 g de azúcar, obtenidos a partir

of storage there were no significant differences, such a difference was shown only at 24 hours and 60 days of storage.

de 10,7 g de azúcares totales, siendo aún motivo de discusión, ya que muchas veces en el etiquetado de las bebidas dicho contenido de azúcares



**Figure 4. Average values of acid content and ascorbic acid from beverages elaborated with three treatments measured in three time of storage period.** Different letters show significant statistical differences ( $p \leq 0.05$ ) in the acid content and ascorbic acid per treatment during storage times.

**Figura 4. Valores promedios del contenido de ácido y ácido ascórbico de las bebidas elaboradas con tres tratamientos medidos en tres tiempos de periodo de almacenamiento.** Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0,05$ ) en el contenido de ácido y ácido ascórbico por tratamiento durante los periodos de almacenamiento.

According to the Ministerio de Salud de Chile (2009), there are foods that must be fortified with different levels of vitamins in order to remedy a specific problem of public health mainly vitamin C (Baltes, 2006), however, carbonated analcoholic drinks can not be added vitamins, being an exception only for beverages whose purpose of elaboration is for athletes consumption.

**Soluble solids.** The results showed a higher content of soluble

reductores es menor, provocando un error en los consumidores a la hora de elegir qué bebida tomar.

**Vitamina C.** Los valores expresados en la figura 4 muestran que las bebidas realizadas en los tratamientos  $T_1$  y  $T_3$  fueron capaces de obtener un mayor contenido de vitamina C, mientras que las bebidas realizadas en el tratamiento  $T_0$  tuvieron un contenido promedio más bajo de este parámetro. El valor más alto de vitamina C se

solids in those beverages made in treatment  $T_0$  (6.0), making a big difference in contrast to beverages made in treatments  $T_1$  (4.1),  $T_2$  (5.0) and  $T_3$  (4.13), during the three storage period (24 hours, 30 and 60 days).

According to the statistical results, it can be mentioned that between the different treatments there were not significant differences; besides, the content of soluble solids was not altered during the 3 storage times. According to the Ministerio de Salud de Chile (2009), through the Sanitary Regulation of Food, the refreshing alcoholic soft drinks are those to which fruit juices have been added and whose content of soluble solids from the fruit is equal or bigger than 10 %  $w/w$  of the soluble solids of the mature fruit being used, in contrast to fancy beverages that contain a less than 10 % content of soluble solids that is declared for the manufacturing of such a beverage.

### Evaluation of sensory attributes

**Acceptability.** The results obtained in the general acceptability evaluation, offered in table 2, panelist showed better acceptability beverage from treatment  $T_2$  (4.08) and  $T_3$  (5.08) at 24 hours of storage and also  $T_3$  (5.87) at 30 days and  $T_0$  (5.18) and  $T_3$  (4.46) at 60 days of storage period. All of this value were in the range of "I do not like it", but "I do not dislike either", respectively.

For beverages made in treatments  $T_1$  and  $T_2$ , the average score during

obtuvo por las bebidas realizadas en los tratamientos  $T_1$  y  $T_3$ , que tenían adición de  $CO_2$ , comparado con el tratamiento  $T_0$  que es solo jugo, los autores consideraron que esto es posible debido a la reacción del dióxido de carbono que siempre tiende a acidificar las muestras y en este caso, aumenta el contenido de vitamina C.

De acuerdo con los datos estadísticos, se puede mencionar que entre los diferentes tratamientos hubo diferencias estadísticamente significativas, lo que contrasta con lo mostrado en la figura 4, ya que a los 30 días de almacenamiento no hubo diferencias significativas, dicha diferencia se mostró sólo a las 24 horas y a los 60 días de almacenamiento.

De acuerdo con el Ministerio de Salud de Chile (2009), existen alimentos que deben ser fortificados con diferentes niveles de vitaminas con el fin de remediar un problema específico de salud pública, principalmente la vitamina C (Baltes, 2006); sin embargo, a las bebidas gaseosas analcohólicas no se les puede añadir vitaminas, siendo una excepción sólo para las bebidas cuya finalidad de elaboración es el consumo de los deportistas.

**Sólidos solubles.** Estos resultados mostraron un contenido más alto de sólidos solubles en aquellas bebidas realizadas en los tratamientos  $T_0$  (6,0), haciendo una gran diferencia en contraste a las bebidas realizadas en los tratamientos  $T_1$  (4,1),  $T_2$  (5,0) y  $T_3$  (4,13), durante tres periodos de almacenamiento (24 horas, 30 y 60 días).

the 60 days of storage was low, placing them at the level of “I slightly like it” with values of “4.00” and “3.95”, respectively. The low rating by the panelists was mainly granted to the texture of the beverages made in the treatments T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub>, perceived with an intensity of the measured attribute closest to the level of “Rough”, due particularly to the own and characteristic flavor of the eggplants because of the large amount of antioxidants they have. According to Vaclavik (2002), acceptability tests are necessary for fresh products since no laboratory test foretell if the public will accept or reject a new product.

De acuerdo a los resultados estadísticos, se puede mencionar que entre los diferentes tratamientos no hubo diferencias significativas; además, el contenido de sólidos solubles no fue alterado durante los 3 periodos de almacenamiento. Según el Ministerio de Salud de Chile (2009), a través del Reglamento Sanitario de alimentos, las bebidas alcohólicas refrescantes son aquellas a las que se les ha agregado jugos de frutas, y en donde el contenido de sólidos solubles de fruta es igual o mayor al 10%  $\frac{w}{w}$  de los sólidos solubles de las frutas maduras, en contraste a las

**Table 2. Average of acceptability, appearance and sensory evaluation attributes.**

**Cuadro 2. Promedio de los atributos de aceptabilidad, apariencia y evaluación sensorial.**

Storage time	Treatments	Acceptability	Appearance	Color	Aroma	Flavor	Texture	Color primer
24 hours	T0	3.95 b	6.18 b	7.00 a	6.16 a	2.84 bc	3.01 b	3.10 a
	T1	3.97 b	5.90 b	5.46 b	6.43 a	2.62 c	5.27 a	2.67 b
	T2	4.08 ab	5.87 b	6.36 ab	6.47 a	3.38 b	5.30 a	3.00 a
	T3	5.08 a	6.69 a	5.61 b	4.68 b	10.26 a	4.63 a	2.72 b
30 days	T0	4.74 b	5.23 b	9.74 a	5.82 a	4.09 b	4.45 a	4.51 a
	T1	4.28 b	5.46 b	5.01 b	5.96 a	3.79 b	5.35 a	2.59 b
	T2	4.26 b	5.26 b	5.95 b	5.47 a	4.74 b	4.84 a	3.03 b
	T3	5.87 a	6.46 a	4.66 b	5.69 a	9.65 a	4.63 a	2.21 b
60 days	T0	5.18 a	5.87 a	4.23 b	4.08 a	2.59 c	2.85 b	2.10 b
	T1	4.00 b	5.51 b	5.13 b	4.68 a	3.41 c	4.85 a	2.59 a
	T2	3.95 b	5.38 b	7.27 a	4.94 a	5.53 b	5.41 a	2.79 a
	T3	4.46 a	5.69 ab	7.30 a	4.87 a	10.71 a	5.54 a	2.87 a

Different letters show significant statistical differences ( $p \leq 0.05$ ).

Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0,05$ ).

The results obtained from the general appearance evaluation offered in table 2 showed a higher value for the beverages made in treatment  $T_3$  at 24 hours and 30 days of storage, resulting in a mean value of "6.57", which means that during the first 2 storage times, the panelists placed it in the level "I slightly like it", while in the 60 days of storage there were the beverages made in treatment  $T_0$ , which obtained the best marks with a value of "5.87"; it means that the panelists placed it at the level "I do not like it, but I do not dislike either". Regarding the statistical analysis for this parameter, it can be mentioned that among the different treatments, there were no statistically significant differences. According to Witting (2001), there is a great relation between the appearance and the attribute color, since the color of the food presents a higher interest when the energy that gets to the eye is from a lighted surface and through the material, in the case of a transparent food. In this case, there was a better relationship between the color and the appearance attributes only for those beverages made in treatment  $T_3$ . In regards to the processes of the beverage production, it should be emphasized that the filtration and pasteurization did not affect the appearance ratings, since beverages made in treatments  $T_0$ ,  $T_1$ ,  $T_2$  and  $T_3$  showed such techniques. The addition of a sweetener, may be responsible of the better evaluation of this appearance, shown in table 2 at 24 hours and 30 days of storage, with the best evaluation of beverages made in treatment  $T_3$  (the only treatment with addition of Sucralose).

bebidas que contienen menos del 10% del contenido de ácidos solubles que son declarados para la elaboración de tales bebidas.

### **Evaluación de atributos sensoriales**

**Aceptabilidad.** En los resultados obtenidos en la evaluación general de aceptabilidad mostrados en el cuadro 2, los panelistas mostraron una mejor aceptabilidad de la bebida del tratamiento  $T_2$  (4,08) y  $T_3$  (5,08) a las 24 horas de almacenamiento; también  $T_3$  (5,87) a los 30 días,  $T_0$  (5,18) y  $T_3$  (4,46) a los 60 días del período de almacenamiento. Todos estos valores estaban en el rango de "no me gusta", pero "tampoco me disgusta", respectivamente.

Para las bebidas realizadas en los tratamientos  $T_1$  y  $T_2$  la puntuación promedio durante 60 días de almacenamiento fue bajo, colocándolos en el nivel de "Me gusta ligeramente" con valores de "4,00" y "3,95", respectivamente. La baja puntuación dada por los panelistas fue principalmente debido a la textura de las bebidas realizadas en los tratamientos  $T_1$  y  $T_2$ , percibidos con una intensidad de atributo medido más cercano al nivel de "áspero", particularmente debido al sabor propio y característico de las berenjenas por la gran cantidad de antioxidantes que tienen. De acuerdo a Vaclavik (2002), las pruebas de aceptabilidad son necesarias para los productos frescos, ya que ninguna prueba de laboratorio predice si el público aceptará o rechazará un nuevo producto.

Los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la apariencia

**Color.** The evaluation of color is an important attribute because color evaluators judge the appearance of the product to be consumed (Arthey and Dennis, 1992). From the statistical results, it can be stated that there were significant differences among the different treatments. According to the panelists' evaluation, beverages made in treatment  $T_0$  during the 24 hours and 30 days of storage showed a color closer to "dark coffee", while 60 days of storage showed the "light coffee"; in addition, beverages made in treatment  $T_1$  showed a lower expression of the color in all the moments of storage, being able to "light coffee". Panelists perceived better color beverage from treatments  $T_0$  (7.0) and  $T_2$  (6.36) at 24 hours of storage and  $T_0$  (9.74) during 30 days and also  $T_2$  (7.27) and  $T_3$  (7.30) during 60 days of storage period, which places it in a color tone "light coffee".

According to studies by Coello *et al.* (2000), they sustain that panelists grant different degrees of acceptability (grades) according to the concentration of color that a beverage presents. For this reason, the acceptability increases, as the clarity and tone of the samples increases. In the evaluation of this attribute, the addition of sweeteners and preservatives did not cause a better rating,  $T_0$  (7.0) and  $T_2$  (6.36) at 24 hours of storage,  $T_0$  (9.74) at 30 days and also  $T_2$  (7.27) and  $T_3$  (7.30) at 60 days of storage period. In addition to, all the pasteurized samples should have shown a similar color.

**Aroma.** For the aroma attribute, there were no statistically significant differences in the overall statistical analysis of treatments, except at 24

general mostrados en el cuadro 2 mostraron un valor más alto para las bebidas realizadas en los tratamientos  $T_3$  a las 24 horas y 30 días de almacenamiento, resultando en un valor medio de "6,57", el cual significa que durante los primeros dos periodos de almacenamiento, los panelistas lo posicionaron en el nivel de "Me gusta ligeramente", mientras que en los 60 días de almacenamiento las bebidas realizadas en el tratamiento  $T_0$  obtuvieron las mejores marcas con un valor de "5,87"; esto significa que los panelistas lo posicionaron en el nivel de "No me gusta, pero tampoco me disgusta". Con respecto al análisis estadístico para este parámetro, se puede mencionar que entre los diferentes tratamientos, no hubo diferencias estadísticamente significativas. De acuerdo a Witting (2001), existe una buena relación entre la apariencia y el atributo de color, cuando la energía que llega al ojo lo hace desde una superficie iluminada y a través del material en el caso de un alimento transparente. En este caso, existió una mayor relación entre el color y la apariencia de atributos solo para aquellas berenjenas realizadas en el tratamiento  $T_3$ . Con respecto a los procesos de la producción de berenjena, debería enfatizarse que la filtración y pasteurización no afectó los rangos de apariencia, aun cuando en las bebidas realizadas en los tratamientos  $T_0$ ,  $T_1$ ,  $T_2$  y  $T_3$  se aplicaron tales técnicas. La adición de un edulcorante puede ser responsable de una mejor evaluación de su apariencia; en el cuadro 2 se muestra que el tratamiento  $T_3$  obtuvo la mejor evaluación de bebidas a las

hours of storage in beverage from treatment  $T_3$  (4.68) which is clearly evident at 30 and 60 days of storage, as shown in table 2. Panelists generally characterized the aroma attribute of beverages made in their different treatments, with a tendency to the intensity of "Insipid", on detriment of the "Intense" rating because the latter rating was practically not considered by the judges. Similarly, the panelists indicated the presence of a characteristic aroma of eggplant in all beverages produced, according to the treatments assigned.

**Flavor.** The statistical analysis for the flavor parameter showed that there were significant differences in the 4 treatments of this trial, as shown in table 2, it is observed how beverages made in treatment  $T_3$  showed the highest ratings by the panelists, during the three period storage,  $T_3$  (10.26) at 24 hours storage and  $T_3$  (9.65) at 30 days and also  $T_3$  (10.71) at 60 days of storage, placing these beverages at the "extremely sweet" level, in contrast with the beverages that were produced according to treatments  $T_0$  and  $T_1$ , which were rated as a "a little sweet flavor". Sucralose is able to remain stable in beverages for a long time under a wide range of pH (2.0 to 8.0) and temperatures (-18 ° C - 210 ° C), and it is also stable to acid and to enzymatic decomposition (Baltes, 2006). The bitter taste of the eggplant juice was masked with the sweetener, i.e. in beverages made in treatment  $T_3$ , the characteristic taste of the fruit was masked with the addition of sucralose.

**Texture.** In regards with the statistical analysis of the texture

24 horas y 30 días de almacenamiento (el único tratamiento con adición de sucralosa).

**Color.** La evaluación del color es un atributo importante ya que los evaluadores del color juzgan la apariencia del producto para ser consumido (Arthey y Dennis, 1992). A partir de los resultados estadísticos, puede decirse que hubo diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. De acuerdo a la evaluación de los panelistas las bebidas realizadas en el tratamiento  $T_0$  durante las 24 horas y 30 días de almacenamiento mostraron un color más cercano al "café oscuro", mientras que a los 60 días de almacenamiento mostraron un color "café claro"; además las bebidas realizadas en el tratamiento  $T_1$  mostraron una expresión de color más baja en todos los momentos de almacenamiento, siendo capaz de tener un color "café claro". Los panelistas percibieron un mejor color de las bebidas de los tratamientos  $T_0$  (7,0) y  $T_2$  (6,36) a las 24 horas de almacenamiento, y  $T_0$  (9,74) durante 30 días y también  $T_2$  (7,27) y  $T_3$  (7,30) durante 60 días de periodo de almacenamiento, lo cual los coloca en un color de tono "café claro".

De acuerdo a los estudios por Coello *et al.* (2000), sostienen que los panelistas otorgan diferentes grados de aceptabilidad (calificaciones) según la concentración de color que presenta una bebida. Por ello, la aceptabilidad aumenta a medida que aumenta la claridad y el tono de las muestras. En la evaluación de este atributo la adición de edulcorantes y conservantes no provocó una mejor



attribute, it can be mentioned, that beverage elaborated with the three treatments at 30 days of storage did not shown statistical difference, it can also be noted that during the 60 days of storage, beverages treated with treatment  $T_0$  obtained qualifications lower than the rest of the treatments, with an average value of “3.43”, with an intensity of the measured attribute of “soft”. Being a liquid product, these sensations of chewing were described as “smooth” or “rough”; besides, vision was also used, when it is considering the size, shape and orientation of the particles (Witting, 2001). As mentioned before, the low qualification of the acceptability attribute by the panelists was granted mainly to the texture of the beverages produced, in which the beverages made in treatments  $T_1$  and  $T_2$  were perceived with an attribute intensity measured closer to the “rough” level, i.e. in some way or another, the texture attribute actually could affected the acceptability of the beverages made in any of the treatments.

### Evaluation of microbiological parameters

The analysis of total coliforms for each beverage treatment carried out by the lab Quality Lab Ltda., offered a value of  $<3$  NMP.  $g^{-1}$ , which according to the Ministerio de Salud de Chile. (2009), through the Reglamento Sanitario de los Alimentos, it means that beverages are within normal parameters because it is indicated that all processed and pasteurized beverages must have a value less than 3 of the most probable number per

calificación:  $T_0$  (7,0) y  $T_2$  (6,36) a las 24 horas de almacenamiento,  $T_0$  (9,74) a los 30 días y también  $T_2$  (7,27) y  $T_3$  (7,30) a los 60 días de periodo de almacenamiento. Además, todas las muestras pasteurizadas deberían haber mostrado un color similar

**Aroma.** Para el atributo de aroma, no existieron diferencias estadísticamente significativas en el análisis estadístico general de todos los tratamientos, excepto a las 24 horas de almacenamiento en las bebidas del tratamiento  $T_3$  (4,68) que es claramente evidente a los 30 y 60 días de almacenamiento, como se muestra en el cuadro 2. Los panelistas caracterizaron en general el atributo aroma de las bebidas elaboradas en sus diferentes tratamientos, con una tendencia a la intensidad de “Insípido”, en detrimento de la calificación de “Intenso”, ya que esta última calificación prácticamente no fue considerada por los jueces. Asimismo, los panelistas indicaron la presencia de un aroma característico a berenjena en todas las bebidas elaboradas, según los tratamientos asignados.

**Sabor.** El análisis estadístico para el parámetro de sabor mostró que existen diferencias significativas en los 4 tratamientos de este ensayo, como se muestra en el cuadro 2, donde se observó cómo las bebidas realizadas en el tratamiento  $T_3$  mostraron las valoraciones más altas por parte de los panelistas durante los tres periodos de almacenamiento:  $T_3$  (10,26) a las 24 horas de almacenamiento,  $T_3$  (9,65) a los 30 días y también  $T_3$  (10,71) a los 60 días de almacenamiento,

gram of sample (NMP.g<sup>-1</sup>) (table 3).

These results confirm that pasteurization was properly carried out, both in time and temperature, which is recognized by Caballero

situando a estas bebidas en el nivel “extremadamente dulce”, en contraste con las bebidas que se produjeron según los tratamientos T<sub>0</sub> y T<sub>1</sub>, que fueron calificadas como un “sabor

**Table 3. Microbiological control in the four treatments 24 hours after the production of the beverage.**

**Cuadro 3. Control microbiológico en cuatro tratamientos 24 horas después de la producción de la bebida.**

Storage time	T0	T1	T2	T3
24 hours	<3 NMP.g <sup>-1</sup>	<3 NMP.g <sup>-1</sup>	<3 NMP.g <sup>-1</sup>	<3 NMP.g <sup>-1</sup>

NMP.g<sup>-1</sup>: The most probable number per gram of sample.

Source: Ministerio de Salud de Chile, 2009.

NMP.g-1: El número más probable por gramo de muestra.

Fuente: Ministerio de Salud de Chile, 2009.

(2008), who state that coliforms are highly resistant to natural conditions and resist drying, although they are inactivated by relatively moderate heat treatments, such as pasteurization (Madigan *et al.*, 2009).

The beverages produced in this trial, divided into different treatments, ensure safety, being a product that can be consumed without causing damages or risks in the consumer health because all the general principles of hygiene were fully accomplished (COAG, 2004). According to the Codex Alimentarius Standard (1997), general food safety includes food safety at such and the guarantee of avoiding any damage to the consumer when the product is being prepared or consumed.

### Conclusions

The addition of CO<sub>2</sub> to eggplant juice allowed to obtain a refreshing

un poco dulce”. La sucralosa es capaz de permanecer estable en las bebidas durante mucho tiempo bajo un amplio rango de pH (de 2,0 a 8,0) y de temperaturas (de -18 °C a 210 °C), y también es estable al ácido y a la descomposición enzimática (Baltés, 2006). El sabor amargo del jugo de berenjena se enmascaró con el edulcorante, es decir, en las bebidas elaboradas en el tratamiento T<sub>3</sub>, el sabor característico de la fruta se enmascaró con la adición de sucralosa.

**Textura.** Con respecto al análisis estadístico del atributo textura, puede mencionarse que las bebidas elaboradas en los tres tratamientos a 30 días de almacenamiento, no mostraron diferencia estadística, también se puede observar que durante los 60 días de almacenamiento, las bebidas tratadas con el tratamiento T<sub>0</sub> obtuvieron calificaciones inferiores al

carbonated soft drink of a good sensorial acceptability and appearance in beverages made with eggplant juice + CO<sub>2</sub> + sodium benzoate + Sucralose (T<sub>3</sub>); highlighting its nutritional contribution, its acidity and content of Vitamin C, as well as safety.

### *End of English Version*

---

resto de los tratamientos, con un valor promedio de “3,43”, con una intensidad del atributo medido de “suave”. Siendo un producto líquido, estas sensaciones de masticación se describieron como “suaves” o “ásperos”; además, también se utilizó la visión cuando se trató de considerar el tamaño, la forma y la orientación de las partículas (Witting, 2001). Como se mencionó anteriormente, la baja calificación del atributo de aceptabilidad por parte de los panelistas fue otorgada principalmente a la textura de las bebidas producidas, en la cual las bebidas elaboradas en los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> fueron percibidas con una intensidad de atributo más cercana al nivel “áspero”, es decir, de una u otra manera el atributo de textura sí pudo afectar la aceptabilidad de las bebidas elaboradas en cualquiera de los tratamientos.

### **Evaluación de los parámetros microbiológicos**

El análisis de los coliformes totales para cada tratamiento de bebida se llevó a cabo por el laboratorio Quality Lab Ltda., arrojando un valor de <3 NMP. g<sup>-1</sup>, que según el Ministerio de Salud de Chile (2009), a través del Reglamento Sanitario de los Alimentos, significa que las bebidas

están dentro de los parámetros normales, ya que se indica que todas las bebidas procesadas y pasteurizadas deben tener un valor menor a 3 del número más probable por gramo de muestra (NMP.g<sup>-1</sup>) (cuadro 3).

Estos resultados confirman que la pasteurización se realizó adecuadamente, tanto en tiempo como en temperatura, lo cual es reconocido por Caballero (2008), quien afirma que los coliformes son altamente resistentes a las condiciones naturales y resisten la desecación, aunque son inactivados por tratamientos térmicos relativamente moderados como la pasteurización (Madigan *et al.*, 2009).

Las bebidas producidas en este ensayo, divididas en diferentes tratamientos, garantizan la seguridad, siendo un producto que puede ser consumido sin causar daños o riesgos a la salud del consumidor porque todos los principios generales de higiene fueron plenamente cumplidos (COAG, 2004). Según el Codex Alimentarius Standard (1997), la seguridad general de los alimentos incluye la seguridad alimentaria en sí misma y la garantía de evitar cualquier daño al consumidor en el momento de preparar o consumir el producto.

### **Conclusiones**

La adición de CO<sub>2</sub> a la berenjena permitió obtener una bebida gaseosa refrescante, con una buena aceptabilidad sensorial y apariencia en las bebidas realizadas con jugo de berenjena + CO<sub>2</sub> + benzoato de sodio + Sucralosa (T<sub>3</sub>); destacando su contribución nutricional, su acidez y el

contenido de vitamina C, así como la seguridad.

### Cited literature

- AOAC. 1990. Association of Oficial Analytical Chemists. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists (AOAC). 15<sup>a</sup> edition. Arlington, Virginia, Inc. 1298p.
- Arthey, D and C. Dennis. 1992. Calidad. Procesado de hortalizas. Zaragoza de España. Editorial Acribia, S.A. pp. 261-268.
- Baltes, W. 2006. Química de los alimentos. 5<sup>o</sup> edición. Zaragoza de España. Editorial Acribia, S.A. 476 p.
- Caballero, T.A. 2008. Temas de Higiene de los Alimentos. La Habana, Cuba. Editorial Ecimed. 20- 28 pp.
- Codex Alimentarius. 1997. Informe de la 29<sup>o</sup> Reunión del comité del Codex sobre higiene de los alimentos. 61p.
- Coello, M., C. Díaz, N. Gómez. 2000. Efectos del color en la aceptabilidad, artificialidad, dulzor e intensidad del sabor de bebidas lácteas. Universidad Complutense de Madrid y Centro de Enseñanza San Pablo CEU. (12): 140-144.
- COAG. 2004. Comité de Agricultura. Seguimiento propuesto por la FAO del informe de la consulta OMS/FAO de expertos sobre la dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Comité de Agricultura (COAG) 18<sup>o</sup> periodo de sesiones. Roma, Italia. 37 p.
- Feng, P., S. Weagant, M. Grant, W. Burkhardt. 2013. Bacteriological analytical manual. 4<sup>o</sup> Edición. Washington de Estados Unidos. Editorial Washington. 529p.
- Fuentes, H. 2008. Bebidas gaseosas y erosión dental. Universidad de Valparaíso. Disponible [www.drhernanfuentes.cl/wpcontent/uploads/2014/05/BEBIDAS\\_GASEOSAS\\_Y\\_ROSION\\_DENTAL\\_CON\\_ANEXO.pdf](http://www.drhernanfuentes.cl/wpcontent/uploads/2014/05/BEBIDAS_GASEOSAS_Y_ROSION_DENTAL_CON_ANEXO.pdf). Fecha de consulta: octubre 2015.
- Garmendia, G. and S. Vero. 2006. Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas. Disponible en [www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rh197/18\\_27.pdf](http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rh197/18_27.pdf). Fecha de consulta: mayo de 2015
- Heras, I., A. Alvis, and G. Arrazola. 2013. Optimización del proceso de extracción de antocianinas y evaluación de la capacidad antioxidante de Berenjena (*Solana melonera* L.). 24(5): 93-102.
- Hernández, E. 2005. Evaluación Sensorial. Bogotá. Colombia. Facultad de ciencias básicas e Ingeniería. Universidad Nacional abierta y a distancia (UNAD). 128p.
- Instituto de Salud Pública de Chile. 2008. Procedimiento recuento de coliformes totales en medio sólido. Disponible en [www.ispch.cl/lab\\_amb/doc/microbiologia\\_alimentos/PRT008.pdf](http://www.ispch.cl/lab_amb/doc/microbiologia_alimentos/PRT008.pdf). Fecha de consulta: mayo de 2015
- López, P.O and M.P. Cerezo. 2008. Potencial erosivo de las bebidas industriales sobre el esmalte dental. Universidad Autónoma de Manizales. Colombia. 9p.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, P.V. Dunlap, and D.P. Clark. 2009. Brock. Biología de los microorganismos. 12<sup>a</sup> Edición. Editorial: Addison-wesley. 1.296p.
- Madrid, V.A. 1994. Métodos oficiales de análisis de los alimentos. España. Editorial A Madrid Vicente Ediciones. 650p.
- Madrid, A., P. Gómez, F. Santiago and M. Madrid. 1997. Refrigeración, congelación y envasado de los alimentos. Editorial A Madrid Vicente Ediciones. 301 p.
- Mainali, R. 2014. Biology and Management of eggplant fruit and shootborer *Leucimodes orbonalis* Guenee (Lepidoptera: Pyralidae). 2(1): 18-28.
- Milleo, J., T. Farago, J. Souza, I. Barbola and J. Castro. 2011. Entomofauna asociada a flores de berenjena y su papel en la producción de los frutos. 70:17-25. Ministerio de Salud de Chile. 2009. Reglamento Sanitario de los Alimentos Decreto. N°977/96. Santiago. 169 p.

- Munsell, A. 1994. Munsell soil color charts. New York of USA.29p.
- Ortiz, S. and J. Vera. 2013. Determinación de azúcares reductores-bebida carbonatada Sprite. Disponible en: <<http://es.scribd>. Madrid, A y Madrid, J. 2001. Nuevo manual de industrias alimentarias. 3° Edición. España. Editorial Mundi - prensa. 625p.
- Sánchez, J., C. de Miguel, M. Ramírez, J. Delgado, M. Franco and D. Martín. 2012. Efecto de las altas presiones hidrostáticas respecto a la pasteurización térmica en los aspectos microbiológicos, sensoriales y estabilidad oxidativa de aceituna.63 (1):100-108.
- Sancho, J., E. Bota. y J. De castro. 1999. Introducción al análisis sensorial de los alimentos. Publications de la Universitat de Barcelona, España 336p.
- Santibáñez, F. and J. Uribe.1993. Atlas agro meteorológico de Chile. Ministerio. Regiones. VI, VII y VIII. Facultad de ciencias agrarias y forestales, Universidad de Chile.
- Vaclavick, V.A. 2002. Fundamentos de ciencia de los alimentos. 1° edición. Zaragoza. España. Editorial Acribia, S.A, 485p.
- Witting, E. 2001. Evaluación sensorial, una metodología actual para tecnología de alimentos. Disponible en [sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_quimicas\\_y\\_farmaceuticas/wittinge0/](http://sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/wittinge0/). Fecha de consulta: junio 2015.
- Zapata, L. 2011.Bebidas de fantasía (gaseosas del tipo cola). Organización deconsumidores y usuarios de Chile.31p.





## Nota técnica / Technical note

# Sacarificación y fermentación de los residuos lignocelulósicos de la naranja para la obtención de bioalcohol

Saccharification and fermentation of the lignocellulosic residues of the orange to obtain bioalcohol

Sacarificação e fermentação dos resíduos lignocelulósicos da laranja para obtenção de bioálcool

Pablo Enrique Alcívar-Mendoza<sup>1,2\*</sup>; José Patricio Muñoz-Murillo<sup>2</sup>; Christhel Alejandra Andrade-Díaz<sup>2</sup> y Alex Alberto Dueñas-Rivadeneira<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Maestría Académica con Trayectoria Profesional en Agroindustria- Instituto de Posgrado. <sup>2</sup>Departamento de Procesos Agroindustriales, Facultad de Ciencias Zootécnicas Universidad Técnica de Manabí, Chone, Ecuador. Correo electrónico: (PA) [palcivar4747@hotmail.com](mailto:palcivar4747@hotmail.com), ; (JM) [jpmunoz@outlook.es](mailto:jpmunoz@outlook.es), ; (CA) [andraded@insa-toulouse.fr](mailto:andraded@insa-toulouse.fr) ; (AD) [alduri81@hotmail.com](mailto:alduri81@hotmail.com) .

## Resumen

La producción y consumo de naranjas genera gran cantidad de residuos lignocelulósicos que son depositados en los vertederos sin recibir ningún tipo de tratamiento que le permita ser aprovechados como subproductos. El objetivo de la presente investigación fue obtener bioalcohol mediante la sacarificación y fermentación de los residuos lignocelulósicos de la cáscara de la naranja (*Citrus sinensis*). Se utilizaron tres (3) niveles de ácido sulfúrico como tratamiento, para alterar la estructura lignocelulósica de la biomasa, posteriormente, se realizó una hidrólisis con enzimas celulasas, analizando la presencia de azúcares reductores por espectrofotometría. La fermentación se efectuó con dos (2) concentraciones de levaduras *Sacharomyces cerevisiae*, posteriormente, se destiló y se determinó la presencia de compuestos orgánicos volátiles por cromatografía de gases. Los azúcares reductores presentes en mayor proporción fueron glucosa (26,60 ±

Recibido el 04-09-2020 • Aceptado el 22-10-2020

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [palcivar4727@hotmail.com](mailto:palcivar4727@hotmail.com)

0,77 g.L<sup>-1</sup>) y fructosa (21,26 ± 0,51 g.L<sup>-1</sup>); el compuesto orgánico volátil de mayor concentración fue etanol (76,96 %) y el índice de mayor rendimiento de bioalcohol se obtuvo con el tratamiento de mayor concentración de ácido sulfúrico y levadura (12,72 ± 0,65 g.L<sup>-1</sup>); las cáscaras de naranja son subproductos de origen vegetal que pueden ser aprovechadas para la producción de bioalcohol con porcentajes de etanol superiores al 76%.

**Palabras clave** Biomasa lignocelulósica, hidrólisis enzimática, subproducto vegetal.

### Abstract

The production and consumption of oranges generates a large amount of lignocellulosic waste that is deposited in landfills without receiving any type of treatment that allows it to be used as by-products. The objective of the present investigation was to obtain bioalcohol through the saccharification and fermentation of lignocellulosic residues of the peel of the orange (*Citrus sinensis*). Three (3) different levels of sulfuric acid were used as treatment, to alter the lignocellulosic structure of the biomass, subsequently, a hydrolysis with cellulase enzymes was carried out, analyzing the presence of reducing sugars by spectrophotometry. The fermentation was carried out with two (2) different concentration levels of *Sacharomyces cerevisiae* yeast, subsequently, it was distilled and the presence of volatile organic compounds was determined by gas chromatography. The reducing sugars present in the highest proportion were: glucose (26.6 ± 0.77 g.L<sup>-1</sup>) and fructose (21.26 ± 0.51 g. L<sup>-1</sup>); the volatile organic compound with the highest concentration was ethanol (76.96%) and the index with the highest bioalcohol yield was obtained with the treatment with the highest concentration of sulfuric acid and yeast (12.72 ± 0.65 g. L<sup>-1</sup>); Orange peels are by-products of vegetable origin that can be used for the production of bioalcohol with percentages of ethanol higher than 76%.

**Keywords:** biomass Lignocellulosic, enzymatic hydrolysis, plant by-product.

### Resumo

A produção e o consumo da laranja geram uma grande quantidade de resíduos lignocelulósicos que são depositados em aterros sanitários sem receber nenhum tipo de tratamento que permita sua utilização como subproduto. O objetivo da presente investigação foi a obtenção do bioálcool por meio da sacarificação e fermentação de resíduos lignocelulósicos da casca da laranja (*Citrus sinensis*). Três (3) níveis de ácido sulfúrico foram utilizados como tratamento, para alterar a estrutura lignocelulósica da biomassa, posteriormente, foi realizada uma hidrólise com enzimas celulase, analisando a presença de açúcares redutores por espectrofotometria. A fermentação foi realizada com duas (2) concentrações de levadura *Sacharomyces cerevisiae*, posteriormente, foi destilada e a presença de



compostos orgánicos volátiles determinada por cromatografía gasosa. Os açúcares reductores presentes em maior proporção foram: glicose ( $26,6 \pm 0,77 \text{ g.L}^{-1}$ ) e frutose ( $21,26 \pm 0,51 \text{ g.L}^{-1}$ ); o composto orgânico volátil com maior concentração foi o etanol (76,96%) e o índice com maior rendimento de bioálcool foi obtido com o tratamento com maior concentração de ácido sulfúrico e levedura ( $12,72 \pm 0,65 \text{ g.L}^{-1}$ ); As cascas de laranja são subprodutos de origem vegetal que podem ser utilizados para a produção de bioálcool com percentuais de etanol superiores a 76%.

**Palavras-chave:** Biomassa lignocelulósica, hidrólise enzimática, subproduto vegetal.

## Introducción

La producción de naranjas (*Citrus sinensis*) a nivel mundial, está estimada en 47,5 millones de toneladas métricas por año (USDA, 2021). El procesamiento y consumo de cítricos genera cantidades considerables de residuos debido a que más de la mitad del fruto son considerados desechos (cáscaras y semillas) (Pascual, 2019). Por lo general los residuos tienden a ser descartados directamente a los vertederos de desechos sin recibir un tratamiento adecuado que permita aprovecharlos de forma eficaz y eficiente (Ordoñez *et al.*, 2018).

Los residuos agrícolas presentan típicamente una composición rica en celulosa, hemicelulosa y lignina (Alata *et al.*, 2019). Esta estructura resulta idónea para ser aprovechada como fuente de energías alternativas, como puede ser la producción de bioalcohol (Benalcázar *et al.*, 2019). La producción de bioalcohol de fuentes vegetales en Europa y Asia se encuentra en una etapa creciente de experimentación y producción debido al gran interés de mitigar el impacto ambiental ocasionado por este tipo

## Introduction

The worldwide oranges production (*Citrus sinensis*) is estimated at 47.5 million metric tons per year (USDA, 2021). The processing and consumption of citrus fruits generates considerable waste amounts because more than half of the fruit, are considered waste (peels and seeds) (Pascual, 2019). In general, waste tends to be discarded directly to dumps without receiving adequate treatment that allows it to be used effectively and efficiently (Ordoñez *et al.*, 2018).

Agricultural residues typically present a composition rich in cellulose, hemicellulose and lignin (Alata *et al.*, 2019). This structure is ideal to be used for an alternative energy source, such as the bioalcohol production (Benalcázar *et al.*, 2019). The bioalcohol production from vegetal sources in Europe and Asia is growing up for experimentation and production, due to the great interest in mitigating the environmental impact caused by this type of waste (Manrique, 2018). However, in Latin American countries this type of research is drastically limited by the lack of technological resources (Manrique, 2018).

de residuos (Manrique, 2018). Sin embargo, en países de América Latina este tipo de investigaciones están drásticamente limitadas por la falta de recursos tecnológicos (Manrique, 2018).

El proceso de obtención de bioalcohol de residuos producidos por la actividad agrícola se realiza por medio de la transformación de la biomasa celulósica en azúcares solubles mediante reacciones químicas o enzimáticas (Melo *et al.*, 2017), convirtiendo los hidratos de carbono fermentables en moléculas de metanol, etanol y propanol (Cando *et al.*, 2019), mediante la ruta enzimática de la glucólisis (degradación de glucosa por vía aerobia) o por la reacción entre la glucosa y el piruvato (ruta de Embden-Meyerhof, o Embden-Meyerhof-Parnas), (Carranza *et al.*, 2015).

La transformación parcial de la biomasa (cáscaras de naranjas) en bioalcohol consiste en aplicar la respectiva reducción de tamaño de la materia prima, separación de aceite esencial del residuo, para proceder a aplicar un tratamiento ácido - alcalino, y a la incorporación de enzimas para optimizar la etapa de sacarificación obteniendo así los eventuales azúcares reductores que serán sometidos a un proceso de fermentación con la incorporación de levaduras y consecuentemente la aplicación de una destilación simple para la obtención potencial de bioalcohol (Morales, 2015).

La biomasa de la naranja (*Citrus sinensis*) tiende a ser colocada directamente en los vertederos de basura sin recibir ningún tipo de

To produce bioalcohol from residues by agricultural activity, is carried out the transformation of cellulosic biomass into soluble sugars through chemical or enzymatic reactions (Melo *et al.*, 2017), converting fermentable carbohydrates into molecules of methanol, ethanol and propanol (Cando *et al.*, 2019), by the enzymatic pathway of glycolysis (glucose degradation aerobically) or the reaction between glucose and pyruvate (Embden-Meyerhof, or Embden-Meyerhof pathway -Parnas), (Carranza *et al.*, 2015).

The biomass partial transformation (orange peels) into bioalcohol consists to realize the respective reduction in the raw material size, then the essential oil separation from the residue to proceed to apply an acid-alkaline treatment besides the enzymes incorporation to optimize the saccharification stage with the purpose to produce the eventual reducing sugars that will be subjected to a fermentation process with yeasts incorporation and consequently the application of a simple distillation to obtain bioalcohol (Morales, 2015).

The oranges biomass (*Citrus sinensis*) tends to be placed directly into garbage dumps without receiving any type of treatment, and can be drawn on using the saccharification and fermentation technology of lignocellulosic residues for bioalcohol production, helping to small, medium and large producers, to have an option to make the most of their production. The objective of this research was the bioalcohol production from the saccharification and fermentation of

tratamiento, y puede ser aprovechada mediante la utilización de la tecnología de sacarificación y fermentación de residuos lignocelulósicos para la producción de bioalcohol, ayudando a los pequeños, medianos y grandes productores, a disponer de una opción para aprovechar al máximo su producción. El objetivo de la presente investigación fue obtener bioalcohol a partir de la sacarificación y fermentación de la biomasa lignocelulósica de la cáscara de la naranja (*Citrus sinensis*).

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Las naranjas (*Citrus sinensis*) de tipo descarte comprendidas entre cuatro (4) y seis (6) cm de diámetro, con apariencia firme, color y olor característico utilizadas en el presente estudio se recolectaron en el centro de acopio Zambrano ubicado en el cantón Flavio Alfaro y el procedimiento experimental se realizó en los laboratorios de la Universidad Técnica de Manabí.

### Obtención de los residuos lignocelulósicos

Una vez recibidas las naranjas se retiró la corteza de forma manual, se procedió a lavarlas con agua potable y se cortaron en forma de cuadros de aproximadamente 0,2-0,5 cm, posteriormente, se colocaron 325 g de las cortezas, en un balón de destilación, se adicionó 575 mL de agua destilada y se realizó la extracción de aceites esenciales, utilizando una manta de calentamiento y un equipo de hidrodestilación con una trampa de

oranges peel lignocellulosic biomass (*Citrus sinensis*).

## Materials and methods

### Vegetal material

In this study, Discard-type oranges (*Citrus sinensis*) with a diameter between four (4) and six (6) cm, firm appearance besides a characteristic color and smell were used. The oranges were picked up at the Zambrano collection center located in the Flavio Alfaro canton and the experimental procedure was carried out in the Universidad Técnica Manabí laboratories.

### Obtaining lignocellulosic residues

Once the oranges were received, the rind was removed manually. They were washed with drinking water and were cut into squares of approximately 0.2-0.5 cm. Subsequently, 325 g of the rinds were placed into a distillation balloon; Then 575 mL of distilled water was added and the essential oils extraction was realized using a heating blanket and a hydrodistillation equipment with a Clevenger trap at a temperature of 90 °C during 170 minutes to eliminate compounds that could interfere with fermentation, the process was carried out three times.

After the hydrodistillation, the crusts were removed from the balloon and placed into an oven (Biobase Brand, BJPX-JUNEAU model) at a temperature of 105 °C for 24 hours in order to eliminate a water content part to obtain a relative humidity of 12%. Then, they were ground in a

Clevenger a una temperatura de 90°C por un tiempo de 170 minutos, con la finalidad de eliminar compuestos que pudieran interferir en la fermentación, el proceso se realizó por triplicado.

Una vez realizada la hidroddestilación, las cortezas se retiraron del balón y se colocaron en una estufa (Marca Biobase, modelo BJPX-JUNEAU) a una temperatura de 105 °C por lapso de tiempo de 24 horas, con la finalidad de eliminar parte del contenido de agua y obtener una humedad relativa de 12 %. Posteriormente, se molieron en un molino (Marca Pulverisette 11) con un disco de abertura de 4,5 mm y una velocidad de rotación de 1700 rpm y se tamizaron en un equipo (Marca AISI 304) con una luz de malla de 0,420 mm (diámetro de 210 mm), hasta obtener un sólido pulverulento.

### **Análisis fisicoquímico de los residuos lignocelulósicos**

El análisis fisicoquímico de los residuos lignocelulósicos de la cáscara de naranja se realizó de acuerdo al Método Oficial (AOAC, 2002). Para efectos de este trabajo se determinó, humedad, pH y fibra no soluble.

### **Tratamiento ácido – alcalino e hidrolisis enzimática**

Se pesaron por triplicado 50 g de los residuos lignocelulósicos de la cáscara de naranja y se colocaron en los reactores discontinuos (Matraces Erlenmeyer de 1000 mL), en dos etapas simultáneas, respectivamente, tratamiento ácido (T1) y tratamiento alcalino (T2). El (T1) consistió en incorporar en los reactores ácido sulfúrico en tres concentraciones (2%, 4% y 6%, respectivamente), se adicionó

mill (Pulverisette 11 Brand) with a 4.5 mm aperture disc with a rotation speed of 1700 rpm and were sieved in an equipment (Brand AISI 304) with a mesh size of 0.420 mm (diameter of 210 mm), until obtained a powdery solid.

### **Physicochemical analysis of lignocellulosic residues**

Was carried out according to the Official Method (AOAC, 2002). For the purposes of this research, the following parameters were determined: humidity, pH and insoluble fiber.

### **Acid-alkaline treatment and enzymatic hydrolysis**

Initially, 50 g of the orange peel residues were weighed at three times and placed into the discontinuous reactors (Erlenmeyer flasks of 1000 mL), in two simultaneous stages, respectively, acid treatment (T1) and alkaline treatment (T2). The (T1) was carried out with sulfuric acid in three concentrations (2%, 4% and 6%, respectively) that were set into the reactors, then distilled water was added in a solid / liquid ratio 1:5 (m/v) and proceeded to heat to 150 °C for 30 min under an atmospheric pressure. For (T2) 0.74 g of calcium hydroxide were added for each gram of lignocellulosic residue in the three reactors. Then, the reactors were leveled to a volume of 720 mL with distilled water. The residues were placed in a 1000 mL beaker, covered with aluminum foil and placed in an oven at a temperature of 90 °C for 26 hours. Once cooled, they were washed several times with distilled water until a clear filtrate was obtained. The washed residues were placed

agua destilada en una relación sólido/líquido 1:5 (m/v) y se procedió a calentar a 150 °C por 30 min a una atmósfera de presión. El (T2) consistió en adicionar en los tres reactores 0,74 g de hidróxido de calcio por cada gramo de residuo lignocelulósico y se enrazó a un volumen 720 mL con agua destilada. Los residuos fueron colocados en un vaso de precipitado de 1000 mL, tapados con papel de aluminio y colocados en una estufa a una temperatura de 90°C por 26 horas. Una vez enfriado, se lavaron por sucesivas ocasiones con agua destilada hasta obtener un filtrado claro. Los residuos lavados se colocaron en vasos de precipitado y se neutralizaron con ácido cítrico al 20 % m/v, para nuevamente lavarlos con agua destilada, con el fin de eliminar los excedentes de hidróxido de calcio presente en la biomasa y proceder a ajustar el pH a 5,3.

Mediante el protocolo descrito, la biomasa se colocó en el reactor, en el cual se adicionaron las enzimas celulasas 12 UI.g<sup>-1</sup> de residuos lignocelulósicos y se incubaron a una temperatura de 50°C por 48 horas, posteriormente, se filtraron con papel Whatman de grado 1 (11 µm) obteniéndose un líquido de color pardo que contenía los azúcares fermentables.

### **Determinación de azúcares reductores**

Para determinar el índice de sacarificación de los residuos lignocelulósicos se realizó la determinación de azúcares reductores, empleando el método colorimétrico con ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), para lo cual se tomó una muestra

in beakers and neutralized with citric acid at 20% m/v, to be washed again with distilled water in order to eliminate the excess of calcium hydroxide present in the biomass and proceed to adjust the pH to 5.3.

Trough the described process, the biomass was placed into the reactor, in which cellulose enzymes 12 IU.g<sup>-1</sup> of lignocellulosic residues were added and incubated at a temperature of 50 °C for 48 hours. Subsequently, they were filtered with paper Whatman grade 1 (11 µm), obtaining a brown liquid with fermentable sugars.

### **Determination of reducing sugars**

To determine the saccharification index of lignocellulosic residues, the determination of reducing sugars was carried out, using the colorimetric method with 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS), for which a sample of four (4) mL was taken and placed in a test tube with 40 mL of distilled water, then was centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes. Once centrifuged, 0.5 mL of the dilution and 0.5 mL of the DNS reagent were added in a test tube, and placed in a bain Marie at 100 °C for a period of five (5) minutes. After It cooled, to room temperature, five (5) mL of distilled water was added. The absorbance measurement was realized on a SPECTRONIC 200 spectrophotometer (Thermo Scientific) at a wavelength of 540 nm. For quantification, a reducing sugars calibration curve was prepared using glucose (200-1000 mg.L<sup>-1</sup>) as standard, and distilled water was used as a blank.

de cuatro (4) mL y se colocó en un tubo de ensayo con 40 mL de agua destilada, seguidamente, se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos. Una vez centrifugada, se adicionó 0,5 mL de la dilución y 0,5 mL del reactivo DNS en un tubo de ensayo y se colocó en un baño maría a 100 °C por un lapso de tiempo de cinco (5) minutos, se enfrió hasta temperatura ambiente y se le adicionó cinco (5) mL de agua destilada. La medición de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro SPECTRONIC 200 (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 540 nm. Para la cuantificación se preparó una curva de calibración de azúcares reductores empleando como estándar glucosa (200-1000 mg.L<sup>-1</sup>), y se utilizó agua destilada como blanco.

### **Fermentación alcohólica y destilación**

El proceso de fermentación alcohólica se realizó en biorreactores adaptados a escala de laboratorio a una temperatura de 30°C durante nueve (9) días. Para ello, el líquido pardo obtenido de la hidrólisis de los tres biorreactores de aproximadamente seis (6) °Brix, se pasteurizó a 90 °C por 10 minutos para lograr inactivar las enzimas, luego se procedió a separar cada uno de los contenidos de los reactores en dos partes iguales para proceder a incorporar en cada reactor previamente adecuado 3 % y 6 % de levadura (*Sacharomyces cerevisiae*) y nutrientes (urea 0,48 g.L<sup>-1</sup> y fosfato ácido de potasio 0,24 g.L<sup>-1</sup>), de acuerdo al procedimiento descrito por Paredes (2016). Al finalizar el proceso de fermentación se procedió a realizar la respectiva destilación utilizando un

### **Alcoholic fermentation and distillation**

Was carried out in bioreactors adapted to a laboratory scale at a temperature of 30 °C for nine (9) days. The brown liquid obtained from the hydrolysis of the three bioreactors with approximately six (6) °Brix, was pasteurized at 90 °C for 10 minutes to inactivate the enzymes. Then it proceeded to separate each of the reactors contents in two equal parts, to incorporate in each reactor, previously adequate with 3% and 6% of yeast (*Sacharomyces cerevisiae*) and nutrients (urea 0.48 g.L<sup>-1</sup> and potassium acid phosphate 0.24 g.L<sup>-1</sup>), according to the procedure described by Paredes (2016). At the end of the fermentation process, the respective distillation was realized using a laboratory distillation equipment to produce the bioalcohol.

### **Volatile organic compounds determination**

The volatile organic compounds determination and the levels of ethanol, methanol, ethyl ether, and acetic acid was performed by gas chromatography using a gas chromatograph (Shimadzu brand, GC-2014 model) under controlled conditions of injection temperature on isocratic conditions at 250 °C for 60 min. The sample injection volume was 2 µL on an RTX 1701 column (30 m x 0.25 µm x 0.32 mm ID) and helium was used as a stripping gas. The quantification was carried out with the external standard method, using pure standards of ethanol, methanol and higher alcohols.



equipo de destilación de laboratorio obteniendo así el bioalcohol.

### **Determinación de compuestos orgánicos volátiles**

La determinación directa de compuestos orgánicos volátiles y niveles de etanol, metanol, éter etílico y ácido acético; se realizó por cromatografía de gases empleando un cromatógrafo de gases (Marca Shimadzu, modelo GC-2014) en condiciones controladas de: temperatura de inyección en condiciones isocráticas a 250 °C por un lapso de tiempo de 60 min. El volumen de inyección de muestra fue de 2 µL en una columna RTX 1701 (30 m x 0,25 µm x 0,32 mm ID) y se usó helio como gas de arrastre. La cuantificación se realizó con el método de estándar externo, utilizando estándares puros de etanol, metanol y alcoholes superiores.

El contenido de bioalcohol expresado en grados Gaylusac se determinó mediante la utilización de un alcoholímetro digital (Marca Alcoscan Profesional, modelo Al 6000 Fda). Se determinó el rendimiento mediante un balance de masa considerando la cantidad de cáscaras de naranjas y la cantidad de bioalcohol obtenido.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

Para el desarrollo experimental se utilizó un diseño factorial A\*B con tres repeticiones por cada uno de los tratamientos. Los factores fueron las tres concentraciones de ácido sulfúrico (2 %, 4 % y 6 %) y dos niveles de levaduras (3 % y 6 %) por cada 100 g de cáscaras de naranja. Los datos se analizaron mediante el paquete

The bioalcohol content expressed in Gaylusac degrees was determined by using a digital breathalyzer (Alcoscan Professional Brand, Al 6000 Fda model). The yield was determined through a mass balance considering the orange peels quantity and the bioalcohol obtained quantity.

### **Experimental design and statistical analysis**

For the experimental development, a factorial design A \* B was used, three times for each of the treatments. The factors were the three concentrations of sulfuric acid (2%, 4% and 6%) and two levels of yeast (3% and 6%) per 100 g of orange peels. The data were analyzed using the IBM SPSS STATISTIC 21 statistical package, the averages were compared using the Tukey test (Multiple Range Test) and the interaction of two factors by the Microsoft Office Excel 2016 program.

### **Results and discussion**

The physicochemical analysis results of the orange peels lignocellulosic residues are showed in Table 1.

The results made it possible to establish the ideal conditions that allowed altering not soluble fiber structure in reducing sugars. The insoluble fibers fraction present in the biomass is compound of 21.9% cellulose, hemicellulose and lignin. These results contrast with the orange peels characterization carried out by Angulo (2018), in which factors; pH, humidity and fiber of this type of biomass are similar.



estadístico IBM SPSS STATISTIC 21, los promedios se compararon mediante la prueba de Tukey (Múltiple Range Test) y la interacción de los dos factores mediante el programa de Microsoft Office Excel 2016.

## Resultados y discusión

Los resultados de los análisis físico-químicos de los residuos lignocelulósicos de las cáscaras de la naranja se presentan en el cuadro 1.

### Cuadro 1. Análisis físico-químicos de los residuos lignocelulósicos de la cáscara de naranja.

**Table 1. Physico-chemical analysis of the orange peel lignocellulosic residues.**

Párametro	Valor
pH	2,8 ± 0,02
Humedad (%)	12 ± 0,3
Fibra no soluble (%)	21,9 ± 0,48

Los resultados posibilitaron establecer las condiciones idóneas que permitieron alterar la estructura de la fibra no soluble en azúcares reductores. La fracción de fibras no solubles presente en la biomasa, está comprendido por 21,9 % de celulosa, hemicelulosa y lignina.

Estos resultados contrastan con la caracterización de cáscaras de naranja realizada por Angulo (2018), en la cual los factores; pH, humedad y fibra de este tipo de biomasa son similares.

La inclusión simultánea de un tratamiento ácido-alcalino a la hidrolisis enzimática, favorece significativamente la producción de azúcares reductores

The simultaneous inclusion of an acid-alkaline treatment to the enzymatic hydrolysis significantly favors the production of reducing sugars specifically when the concentration of sulfuric acid is increased to six (6) %, as shows table 2, differing from the results of the research realized by Padilla (2019), who only obtained levels of reducing sugars such as glucose in the range of 2.45 g.L<sup>-1</sup> - 4.90 g.L<sup>-1</sup>, without applying any type of treatment prior

to enzymatic hydrolysis. However, is important to mention that, in the saccharification stage, similar conditions of time (48h), temperature (50 °C) and pH (5.3) were used.

According to Seogn *et al.* (2015), the use of sugars release (glucose, fructose and galactose) present in the hydrolyzate by the usage of a single variety of enzyme (cellulases), could increase their levels. Additionally, the author points out that it is more convenient to inoculate a mixture of specific enzymes (pectins, cellulases, glucosidases) to release a spectrum of greater reducing sugars variety (mannose, xylose, arabinose and

específicamente cuando se aumenta la concentración de ácido sulfúrico al seis (6) % como se puede evidenciar en el cuadro 2, diferenciándose de los resultados de la investigación realizada por Padilla (2019), quién sólo obtuvo niveles de azúcares reductores como la glucosa en el rango de 2,45 g.L<sup>-1</sup> - 4,90 g.L<sup>-1</sup>, sin aplicar ningún tipo de tratamiento previo a la hidrólisis enzimática; cabe destacar que, en la etapa de sacarificación se utilizaron condiciones similares de tiempo (48h), temperatura (50°C) y pH (5,3).

rhamnose) that directly influence bioalcohol levels in fermentation process.

The results obtained in the fermentation process with two levels of *Sacharomyces cerevisiae* yeast, under standardized temperatures (30 °C) for 9 days and subjected to a simple distillation, to produce bioalcohol from orange peels, are presented in Table 3.

Comparing the different treatments in this research, it can be observing that with treatment B3 (6% sulfuric acid and 6% yeast) the highest bioalcohol production was

**Cuadro 2. Contenido de azúcares reductores (g.L<sup>-1</sup>) en los residuos lignocelulósicos de la cáscara de naranja.**

**Table 2. Reducing sugars content (g.L<sup>-1</sup>) in the lignocellulosic orange peel residues.**

Tratamiento	Glucosa	Fructosa	Galactosa	Arabinosa	Xilosa
2% (m <sup>o</sup> )	19,07a ± 0,51	20,35a ± 0,50	0,44a ± 0,21	0,48a ± 0,14	0,16a ± 0,08
4% (m <sup>o</sup> )	20,08b ± 0,60	21,34b ± 0,56	0,51a ± 0,15	5,69b ± 0,28	1,25b ± 0,53
6% (m <sup>o</sup> )	26,4c ± 0,77	21,26b ± 0,51	2,25b ± 0,18	6,01c ± 0,27	1,56c ± 0,25
ANOVA P(0,05)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Los valores son medias (n=3) con su desviación típica y las medias que poseen las mismas letras no representan una diferencia significativa a P (0,05) según la prueba de Tukey.

The values are means (n = 3) with their standard deviation and the means that have the same letter; Do not represent a significant difference at P (0.05), according to the Tukey test.

Según los datos obtenidos en el cuadro 2 es notable que el tratamiento ácido-alcalino favorece drásticamente el proceso de sacarificación producida por las enzimas celulasas, las cuales, al ser adicionadas en cada residuo previamente tratado, garantizan un índice positivo de ruptura de celulosa (liberación de azúcares) en condiciones estandarizadas de tiempo, temperatura y pH.

obtained (12.72 g.L<sup>-1</sup>), which directly influenced the processes fermentation and distillation. These results are lower than those obtained in the research carried out by Seogn *et al.* (2015), who using an immobilized cell reactor (ICR) in the fermentation obtained ethanol concentrations of 29.5 g. L<sup>-1</sup>.

In relation to the rest of the evaluated treatments, the treatment

De acuerdo con Seogn *et al.* (2015), el aprovechamiento de la liberación de azúcares (glucosa, fructosa y galactosa) presentes en el hidrolizado por la utilización de una sola variedad de enzima (celulasas), podría incrementar sus niveles. Adicionalmente, el autor señala que es de mayor conveniencia inocular una mezcla de enzimas específicas (pectinadas, celulasas, glucosidasas) para liberar un espectro de mayor variedad de azúcares reductores (manosa, xilosa, arabinosa y ramnosa) que influyen directamente en los niveles de bioalcohol en el proceso de fermentación.

Los resultados obtenidos en el proceso de fermentación con dos niveles de levadura *Sacharomyces cerevisiae*, por un lapso de tiempo (9 días) y temperaturas (30°C) estandarizados y sometidos a una destilación simple para la obtención de bioalcohol de las cáscaras de naranja, se presentan en el cuadro 3.

### Cuadro 3. Rendimiento de bioalcohol (g.L<sup>-1</sup>) de los residuos lignocelósicos de cáscara de naranja.

Table 3. Bioalcohol yield (g.L<sup>-1</sup>) of the orange peel lignocelulosic residues.

Tratamiento	Contenido de alcohol (g.L <sup>-1</sup> )
A1 (3 % lev) (2 % acd)	8,56a ± 0,52
A2 (3 % lev) (4 % acd)	9,8b ± 0,61
A3 (3 % lev) (6 % acd)	11,52c ± 0,09
B1 (6 % lev) (2 % acd)	8,63a ± 0,36
B2 (6 % lev) (4 % acd)	10,43d ± 0,48
B3 (6 % lev) (6 % acd)	12,72e ± 0,65
ANOVA P(0,05)	<0,001

Los valores son medias (n=3) con su desviación típica y las medias que poseen las mismas letras no representan una diferencia significativa a P (0,05) según la prueba de Tukey. lev = Levadura *Sacharomyces cerevisiae*. acd = ácido sulfúrico.

The values are means (n = 3) with their standard deviation and the means that have the same letter; Do not represent a significant difference at P (0.05), according to the Tukey test. lev = *Sacharomyces cerevisiae* yeast. acd = sulfuric acid.

Puede observarse que, de los diferentes tratamientos en estudio, con el tratamiento B3 (6 % de ácido sulfúrico y 6% de levadura) se obtuvo la mayor producción de bioalcohol (12,72 g.L<sup>-1</sup>), lo cual influyó directamente en los procesos de fermentación y destilación. Estos resultados son menores a los obtenidos en la investigación realizada por Seogn *et al.* (2015), quien al utilizar un reactor celular inmovilizado (ICR) en la fermentación obtuvo concentraciones de etanol de 29,5 g.L<sup>-1</sup>.

Con respecto al resto de los tratamientos evaluados, con el tratamiento A1 (2% de ácido sulfúrico y 3 % de levadura), se obtuvo el menor contenido de bioalcohol (8,56 g.L<sup>-1</sup>), contrastando con los resultados obtenidos por Padilla (2019), en el cual los índices de rendimiento de producción de bioalcohol están en el rango de 1,65 g.L<sup>-1</sup> a 4,16 g.L<sup>-1</sup> sin aplicar un tratamiento ácido – alcalino.

El bioalcohol obtenido de los residuos lignocelulósicos de la cáscara de naranja (*Citrus Sinensis*) fue sometido a la determinación de la graduación alcohólica y el contenido de sustancias orgánicas mediante cromatografía de gases. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 4.

El bioalcohol obtenido de los residuos lignocelulósicos de la naranja por sacarificación y fermentación posee 43 grados Gay Lussac (°GL) y está constituido principalmente por etanol (76,96 %), siendo este valor superior al reportado por Benalcázar (2019), en la generación de un biocombustible de cáscaras

generation from orange and potato peels had an ethanol percentage of 73.92%. This difference could be on the hydrolysis stage, in which a greater quantity of reducing sugars was produced and therefore a greater quantity of ethanol was obtained.

Other organic substances such as 2,3 dihydrofuran, methanol, ethyl ether are present in a lower proportion.

## Conclusion

Lignocellulosic residues constitute one of the main vegetable by-products that tend to be disposed without receiving any type of treatment within the agri-food industry and for being carbohydrates with high molecular weight, they are not brought under an adequate process to be used. In this case, the orange peels (*Citrus sinensis*) were subjected to an acid-alkaline treatment, saccharified by enzymatic hydrolysis with cellulose enzymes, fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeasts and distilled. Obtaining as a result bioalcohol with a 76.96% ethanol, which allows to propose this process as an alternative to maximize the use not only of the orange peels, otherwise all types of vegetal biomass that has within its compositional structure a high fiber content that can be used as a by-product taking into account that the research is the first step to carry out an agro-industrial process.

---

*End of English Version*

---

de naranja y papa, en el cual el porcentaje de etanol es de 73,92 %. Esta diferencia pudiera radicar en la etapa de hidrólisis, en las cuales se produjo una mayor cantidad de

azúcares reductores y por ende se obtuvo una mayor cantidad de etanol.

Otras sustancias orgánicas como 2,3 dihidrofurano, metanol, éter etílico están presentes en menor proporción

#### Cuadro 4. Contenido de sustancias orgánicas (%).

Table 4. Organic substances content (%).

Descripción	Cantidad %
Etanol	76,96
2,3 Dihydrofuran	21,86
Metanol	0,71
Éter etílico	0,47
Ácido acético	0,00

#### Conclusión

Los residuos lignocelulósicos constituyen unos de los principales subproductos vegetales que tiende a ser desechados directamente sin recibir ningún tipo de tratamiento dentro de la industria agroalimentaria y por ser carbohidratos de alto peso molecular no son sometidos a un proceso adecuado para ser aprovechados dentro de la industria, ante lo cual una vez sometida la cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*) a un tratamiento ácido-alcalino, sacarificado mediante hidrólisis enzimáticas con enzimas celulasas, fermentado con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y destilado se obtuvo un bioalcohol con un 76,96% de etanol, lo cual permite plantear como una alternativa para el aprovechamiento máximo no solo de las cáscaras de naranja sino de todo tipo de biomasa vegetal que posee dentro de su estructura composicional un alto contenido de

fibra que puede ser aprovechada como subproducto Teniendo en cuenta que la investigación es el primer paso para realizar un proceso agroindustrial.

#### Literatura citada

- Alata, E., Y. Cuadros, L. Miranda, y E. Medina. 2019. Biopelículas Producidas con Cáscaras de Naranja y Reforzadas con Celulosa Bacteriana. Rev. Soc. Quím. Perú. 85(2), 231-241. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v85n2/a10v85n2.pdf>
- Angulo, V. 2018. Caracterización de subproductos agroindustriales: naranja y maracuyá. Rev. Ingeniería y Región. 20: 59-66. Disponible en: <https://journalusco.edu.co/index.php/region/article/view/1916>.
- AOAC. 2002. Official Methods of Analysis. 17 ed. USA. Disponible en: [www.aoac.org](http://www.aoac.org).
- Benalcázar, H., M. Benavides, D. Córdoba y P. Ortega. 2019. Generación de un biocombustible, producto de la cáscara de naranja y papa. Boletín Informativo CEI. 6(1), 89-96. Disponible en: <http://editorial.umariana.edu.co/revistas/index.php/BoletinInformativoCEI/article/download/1953/2032>




- USDA, United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. 2021. Citrus: World Markets and Trade. Available in: en: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>
- Cando, S., R. Fernández y K. Cando. 2019. Los biocombustibles: análisis de los cultivos energéticos y la biomasa lignocelulósica. Universidad Ciencia y Tecnología. 1(3):132-138. Disponible en: <http://uctunexpo.autanabooks.com/index.php/uct/article/view/96/95>
- Carranza, D., J. Alvarado, D. Méndez, C. Valenzuela y J. Solanilla. 2015. Pretratamiento de residuos de banano para la obtención de azúcares fermentables. Rev. venez. cienc. tecnol. Alimento. 6(1): 22. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/298524897\\_Pretreatment\\_of\\_residues\\_from\\_plantain\\_Musa\\_paradisica\\_L\\_AAB\\_and\\_arracacha\\_Arracacia\\_xanthorrhiza\\_Bancroft\\_for\\_obtaining\\_fermentable\\_sugars](https://www.researchgate.net/publication/298524897_Pretreatment_of_residues_from_plantain_Musa_paradisica_L_AAB_and_arracacha_Arracacia_xanthorrhiza_Bancroft_for_obtaining_fermentable_sugars)
- Manrique, A. 2018. Visión general del aprovechamiento de residuos cítricos como materia prima de biorrefinerías. Cuadernos del Tomás, (10): 153-168. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6573031.pdf>
- Melo, J., S. Saavedra, A. Jacipt. 2017. Evaluación de la adsorción de Cu<sup>+2</sup> y azul de metileno en biosorbentes de bajo costo obtenidos a partir de biomasa residual de la agroindustria de cítricos. Revista Ambiental Agua, Aire y Suelo 8(2):15-26. Disponible en: [http://revistas.unipamplona.edu.co/ojs\\_viceinves/index.php/RA/article/view/3277/1911](http://revistas.unipamplona.edu.co/ojs_viceinves/index.php/RA/article/view/3277/1911)
- Morales, S. 2015. Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias, Departamento de Química-Física Aplicada. Tesis doctoral. Disponible en: [https://digital.csic.es/bitstream/10261/132717/1/morales\\_de\\_la\\_rosa\\_silvia.pdf](https://digital.csic.es/bitstream/10261/132717/1/morales_de_la_rosa_silvia.pdf)
- Ordoñez, E., D. Reátegui y J. Villanueva. 2018. Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y hojas de doce cítricos. Sci. agropecu. 9(1), 113-121 Padilla, R. 2019. Obtención de bioetanol a partir de residuos de naranja (*Citrus sinensis*) y limón (*Citrus aurantifolia*) mediante enzimas celulolíticas. Universidad Tecnológica Equinoccial. Facultad Ciencias de la Ingeniería e Industrias, Ingeniería Ambiental y Manejo de Riesgos Naturales. Tesis - UIO <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/20705>
- Paredes, D. 2016. Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo de banano. Revista Tecnológica-ESPOL, 23(1): 81-88
- Pascual, I. 2019. Producción Biotecnológica de Ácido D-Láctico a partir de residuos de naranja. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Ingeniería Química y de Materiales. Tesis doctoral. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/58053/1/T41519.pdf>
- Seogn, Ch., Y. Lee, S. Kumar, B. Jae y H. Jong. 2015. A low-energy, cost-effective approach to fruit and citrus peel waste processing for bioethanol production. Applied Energy. 140, 65-74.

## Preferencias hacia la marca y origen del ajo (*Allium sativum* L.)

Preferences towards the brand and origin of garlic  
(*Allium sativum* L.)

Preferências em relação à marca e origem do alho (*Allium  
sativum* L.)

Alma Teresita Velarde-Mendivil<sup>1</sup>, Dena María Camarena-  
Gómez<sup>1\*</sup> y Lizbeth Salgado-Beltrán<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Contabilidad, Universidad de Sonora, México. Blvd. Luis Encinas s/n, C.P. 83000, Col. Centro. Correo electrónico: (AV) [alma.velarde@unison.mx](mailto:alma.velarde@unison.mx), ; (DC) [dena.camarena@unison.mx](mailto:dena.camarena@unison.mx), . <sup>2</sup>Departamento de Economía, Universidad de Sonora, México. Blvd. Luis Encinas s/n, C.P. 83000, Col. Centro. Correo electrónico: [lizbeth.salgado@unison.mx](mailto:lizbeth.salgado@unison.mx), .

### Resumen

El ajo es una de las hortalizas más conocidas y de mayor consumo en el ámbito internacional. En cuanto a su producción los países asiáticos se identifican como los principales productores a nivel global. México tiene una producción significativa de ajo, ocupando el cuarto lugar por su volumen productivo en América Latina y en algunas regiones como en el municipio de Arizpe, Sonora existe una vocación productiva, contribuyendo a la economía de la región y al sustento familiar. De ahí que, para un importante número de pequeños productores, sea fundamental mantenerse competitivos en el mercado del ajo. Como estrategia de posicionamiento, la creación de una marca regional emerge como una alternativa factible. Es por ello que, y con el fin de conocer las preferencias que los consumidores manifiestan hacia el ajo de Arizpe, se llevó a cabo un experimento de elección, metodología ampliamente utilizada en los estudios de marketing agroalimentario, se utilizó el software NGene para el análisis de datos y en el software Limdep, se procedió a la estimación de un modelo logit condicional. Se observa en los resultados que la marca del fabricante y el origen regional ejercen una influencia positiva en los consumidores. Se advierte que los consumidores estarían dispuestos a pagar un sobreprecio si los productos presentan el atributo de marca regional o nacional. Esta información deja entrever la posibilidad que

Recibido el 22-07-2020 • Aceptado el 17-01-2021

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [dena.camarena@unison.mx](mailto:dena.camarena@unison.mx)



existe para los pequeños productores de la región de estudio de posicionarse en el mercado con una marca de ajo regional.

**Palabras clave:** experimento de elección, preferencias del consumidor, marca regional.

### Abstract

Garlic is one of the best known and most widely consumed vegetables in the international field. Regarding its production, Asian countries are identified as the main producers at a global level. Mexico have a significant production of garlic, occupying the fourth place for its productive volume in Latin America and in some regions such as the municipality of Arizpe, Sonora has a productive vocation, contributing to the region's economy and family support. Hence, for a significant number of small producers, it is essential to remain competitive in the garlic market. As a positioning strategy, the creation of a regional brand emerges as a feasible alternative. That is why, and in order to know the preferences that consumers manifest towards Arizpe garlic, an experiment of choice was carried out, a methodology widely used in agri-food marketing studies, the NGene software was used for the analysis of data and in the Limdep software, a conditional logit model was estimated. The results show that the manufacturer's brand and regional origin exert a positive influence on consumers. It is noted that consumers would be willing to pay a premium if the products have the regional or national brand attribute. This information suggests the possibility that exists for small producers in the study region to position themselves in the market with a regional garlic brand.

**Keywords:** experiment of choice, consumer preferences, regional brand.

### Resumo

O alho é uma das hortaliças mais conhecidas e de maior consumo no âmbito internacional. Considerando a sua produção, os países asiáticos são os principais produtores a nível global. No México existe uma produção significativa de alho, ocupando o quarto lugar em volume produtivo na América Latina e em algumas regiões como o município de Arizpe, Sonora existe uma vocação produtiva, contribuindo à economia da região e ao sustento familiar. É por isso fundamental para um importante número de pequenos produtores manter-se competitivos no mercado do alho. Como estratégia de posicionamento, a criação de uma marca regional surge como uma alternativa factível. É por isso que, e com o fim de conhecer as preferências que os consumidores manifestam em relação ao alho de Arizpe, se levou a cabo um experimento de eleição, metodologia muito utilizada nos estudos de marketing agro - alimentar, se utilizou o software NGene para a análise dos dados e no software Limdep se realizou a estimação de um modelo logit condicional. Observa-se nos resultados que a marca do fabricante e a origem

regional exercem uma influencia positiva nos consumidores. Nota-se que os consumidores estariam dispostos a pagar um sobrepreço se os produtos possuem o atributo de marca regional ou nacional. Esta informação permite vislumbrar a possibilidade que existe para os pequenos produtores da região de estudo de posicionar-se no mercado com uma marca de alho regional.

**Palavras chave:** experimento de eleição, preferências do consumidor, marca regional.

## Introducción

El ajo es uno de los cultivos más conocidos y utilizados en el mundo. Sus diversos usos han favorecido su demanda, además, su fácil adaptación y características agronómicas han permitido su expansión productiva a distintas regiones. En la actualidad China, India, Bangladesh, República de Corea y Egipto son los países que más se destacan en su producción, ya que cuentan con el 85,0% de la superficie cosechada y el 93,0% de la producción mundial en el 2018 (FAOSTAT, 2019). En el contexto de Latinoamérica, México ocupa la cuarta posición como productor, detrás de Argentina, Brasil y Perú (FAOSTAT, 2019). A nivel nacional el estado de Sonora contribuye con un 6% de la producción de ajo, ubicándose como el tercer estado productor en el país (SIAP, 2020). La producción de ajo en el estado, se concentra en cinco municipios Arizpe, Ures, Hermosillo, Bacoachi y Naco; siendo Arizpe el principal productor con una aportación del 54% del total del Estado, seguido por Ures con un 10,0% y Hermosillo con un 9,5% (SIAP, 2020).

En el contexto nacional, las variedades cultivadas de ajo son de una amplia diversidad, principalmente

## Introduction

Garlic is one of the best known and most widely used crops in the world. Its various uses have favored its demand, in addition, its easy adaptation and agronomic characteristics have allowed its productive expansion to different regions. Currently China, India, Bangladesh, Republic of Korea and Egypt are the countries that stand out the most in their production, since they have 85.0% of the harvested area and 93.0% of the world production in the 2018 (FAOSTAT, 2019). In the context of Latin America, Mexico occupies the fourth position as a producer, behind Argentina, Brazil and Peru (FAOSTAT, 2019). At the national level, the state of Sonora contributes 6% of garlic production, ranking as the third producing state in the country (SIAP, 2020). Garlic production in the state is concentrated in five municipalities Arizpe, Ures, Hermosillo, Bacoachi and Naco; Arizpe being the main producer with a contribution of 54% of the total of the State, followed by Ures with 10.0% and Hermosillo with 9.5% (SIAP, 2020).

In the national context, the cultivated varieties of garlic are of a vast diversity, mainly as a result of the

como resultado de las distintas condiciones climáticas y de suelo que caracteriza a los principales estados productores de este cultivo. En lo que respecta a variedades cultivadas en Sonora, algunas investigaciones indican que las de mayor rendimiento fueron Tacatzcuaro, Inifap 94, Tocumbo, Huerteño, Chapingo, Celayense y Tacatzcuaro (Sabori *et al.*, 2017, Macías-Duarte *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2007). Específicamente de la región estudiada, las variedades son: la Ampelo, Chino, Perla, Taiwán, Morado Regional, California Early, California Late, Criollo y Rojo cuenca (Chávez *et al.*, 2008).

Respecto al consumo de ajo por persona, en México, se estima de 500 gramos al año; de dicho consumo se considera que el 82,0% corresponde al consumo de ajo fresco y un 18,0% a una variedad derivada de productos procesados (Prochile, 2019). Por lo anterior, el ajo, es un cultivo con alta demanda, de fácil producción y con un mercado en expansión. Sin embargo, la competitividad de los mercados internacionales ha llevado a un importante número de pequeños productores a salir del escenario comercial. Los productores de ajo de Sonora no son la excepción, el mantenerse en el mercado cada vez resulta más complicado. La falta de una estructura comercial conlleva a una pérdida de beneficios, ya que generalmente comercializan el producto a granel o directamente de las parcelas, sin otorgar un valor añadido.

En el caso de Arizpe, la producción de ajo, además de formar parte de

different climatic and soil conditions that characterize the main producing states of this crop. Regarding varieties grown in Sonora, some research indicates that the highest yielding ones were Tacatzcuaro, Inifap 94, Tocumbo, Huerteño, Chapingo, Celayense and Tacatzcuaro (Sabori *et al.*, 2017, Macías-Duarte *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2007). Specifically, from the region studied, the varieties are: Ampelo, Chino, Perla, Taiwan, Morado Regional, California Early, California Late, Criollo and Rojo Cuenca (Chávez *et al.*, 2008).

Regarding the consumption of garlic per person, in Mexico, it is estimated at 500 grams per year. Of this consumption, it is considered that 82.0% corresponds to the consumption of fresh garlic and 18.0% to a variety derived from processed products (Prochile, 2019). Therefore, garlic is a crop with high demand, easy to produce and with an expanding market. However, the competitiveness of international markets has led a significant number of small producers to leave the commercial scene. Sonoran garlic producers are no exception, staying in the market is becoming increasingly difficult. The lack of a commercial structure leads to a loss of profits, since they generally market the product in bulk or directly from the parcels, without giving added value.

In the case of Arizpe, the production of garlic, in addition to being part of a crop where there is tradition in its sowing, is considered a strategic crop according to Chávez (2010), it is one of the few profitable and competitive

un cultivo donde existe tradición en su siembra, se considera un cultivo estratégico de acuerdo con Chávez (2010), es de las pocas opciones rentables y competitivas de la zona serrana de Sonora. En este sentido, el cultivo genera más de 120 jornales por hectárea y su valor comercial asciende de \$60 mil a \$80 mil pesos por hectárea. Estas características le posicionan como una hortaliza, que puede convertirse en una opción de desarrollo para la comunidad.

Desde la perspectiva comercial es necesario identificar elementos que diferencian al producto y que le permiten posicionarse en el mercado. En estalínea, se advierte que la percepción de la calidad en los productos en ocasiones esta relacionada con la marca del producto o a su lugar de origen, en el primer caso, la marca utilizada por empresas de productos básicos, donde los bienes o servicios son muy poco diferenciados, se considera una alternativa para competir más allá del precio y volumen, esto facilita al producto con marca a permanecer en el mercado donde existe una tendencia constante hacia precios bajos (Dumlupinar, 2006).

Sobre el lugar de origen, recientemente ha aumentado el interés por el origen en los alimentos, como resultado se incentiva la producción y consumo de productos locales; derivado del temor percibido por el consumidor en la industrialización y desconocimiento de lugar de procedencia de los alimentos, induciendo al consumidor a reducir este riesgo al vincularse

options in the mountainous area of Sonora. In this sense, the crop generates more than 120 wages per hectare and its commercial value rises from \$ 60,000 to \$ 80,000 pesos per hectare. These characteristics position it as a vegetable garden, which can become a development option for the community.

From a commercial perspective, it is necessary to identify elements that differentiate the product and that allow it to position itself in the market. In this line, it is noted that the perception of quality in products is sometimes related to the brand of the product or its place of origin, in the first case, the brand used by companies of basic products, where the goods or services are truly little differentiated, it is considered an alternative to compete beyond price and volume, this facilitates the branded product to remain in the market where there is a constant trend towards low prices (Dumlupinar, 2006).

Regarding the place of origin, interest in the origin of food has recently increased, as a result the production and consumption of local products is encouraged; derived from the fear perceived by the consumer in industrialization and ignorance of the place of origin of the food, inducing the consumer to reduce this risk by being linked to external attributes such as price, label and stamps of origin (Agudelo *et al.*, 2019; Castillo *et al.*, 2017). With regard to agri-food products, it becomes relevant to distinguish qualities of food and beverages appreciated by consumers (Profeta *et al.*, 2012).

con atributos externos como precio, etiqueta y sellos de origen (Agudelo *et al.*, 2019; Castillo *et al.*, 2017). En lo que respecta a productos agroalimentarios cobra relevancia para distinguir cualidades de alimentos y bebidas apreciadas por los consumidores (Profeta *et al.*, 2012).

Resulta evidente que la marca y el origen son elementos básicos para tener en cuenta al revalorizar el producto como es el ajo de Arizpe, que cuenta con condiciones del entorno y climáticas que lo hacen ser un producto con cualidades distintivas, aunado a ser un cultivo tradicional para sus pobladores, que al fusionarse estos elementos puede incidir en peculiares formas de producir alimentos de acuerdo con Agudelo *et al.*, (2019); Otero, (2015) y Díaz y García, (2014). No obstante, el generar una marca no es suficiente si no se conoce la actitud y percepción que tienen los consumidores hacia el producto, es por ello que el objetivo de esta investigación fue conocer las preferencias de los consumidores hacia la marca y el origen del ajo de Arizpe, así como su disposición a pagar por estos atributos, la finalidad que se persigue es conocer el potencial de aceptación que tendría una marca regional en el mercado, ya que a partir de su generación se pretende incrementar la competitividad y, mediante unas adecuadas estrategias de comercialización, un mejor posicionamiento del producto en el mercado.

It is evident that the brand and origin are basic elements to consider when revaluing the product, such as Arizpe garlic, which has environmental and climatic conditions that make it a product with distinctive qualities, coupled with being a traditional crop. For its inhabitants, that by merging these elements can affect peculiar ways of producing food according to Agudelo *et al.*, (2019); Otero, (2015) and Díaz and García, (2014). However, generating a brand is not enough if the attitude and perception that consumers have towards the product is not known, which is why the objective of this research was to know the preferences of consumers towards the brand and the origin of garlic from Arizpe, as well as its willingness to pay for these attributes, the aim is to know the acceptance potential that a regional brand would have in the market, since from its generation it is intended to increase competitiveness and, through appropriate marketing strategies, better positioning of the product in the market.

## Materials and methods

To achieve the objective of the study of analyzing the attitude and preferences of fresh garlic consumption, a questionnaire was applied to consumers using the methodology of the choice experiment, which consists of simulating a real market situation and allows understanding how consumers structure their choices, in addition to being widely used in agri-food marketing studies (Lagerkvist *et al.*,

## Materiales y métodos

Para lograr el objetivo del estudio de analizar la actitud y preferencias de consumo de ajo fresco, se aplicó un cuestionario a consumidores utilizando la metodología del experimento de elección, que consiste en simular una situación real de mercado y permite entender cómo los consumidores estructuran sus elecciones, además de ser ampliamente utilizada en los estudios de marketing agroalimentario (Lagerkvist *et al.*, 2014; Scozzafava *et al.*, 2014; Bechtold y Abdulai, 2014 *inter alia*). Una vez recopilada la información mediante un modelo *logit* condicional se estiman las preferencias de los consumidores.

### Selección de la muestra

El estudio se realizó con consumidores de la ciudad de Hermosillo, Sonora, localidad ubicada al noroeste de México, con una población de 884,273 habitantes (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2015), el tamaño de la muestra fue de 268 individuos, con un error muestral del 6,0% y un nivel de confianza del 95%. Se realizó un muestreo probabilístico aleatorio simple. El rango de edad de los participantes osciló entre 18 y 74 años.

### Diseño del experimento de elección

Se consideraron 3 atributos (marca, precio y origen), cada uno con 3 niveles. Los atributos y niveles se combinan tomando como referencia la expresión  $L^A$  (Henser *et al.*, 2005), donde L es el número de niveles y A corresponde al número de atributos. Se estimaron 2 alternativas, los atributos

2014; Scozzafava *et al.*, 2014; Bechtold and Abdulai, 2014 *inter alia*). Once the information is collected using a conditional *logit* model, preferences are estimated of consumers.

### Sample selection

The study was carried out with consumers from the city of Hermosillo, Sonora, a town located in the northwest of Mexico, with a population of 884,273 inhabitants (National Institute of Statistics and Geography, 2015), the sample size was 268 individuals, with a 6.0% sampling error and 95% confidence level. Simple random probability sampling was performed. The age range of the participants ranged from 18 to 74 years.

### Design of the choice experiment



Three attributes were considered (brand, price and origin), each with 3 levels. The attributes and levels are combined taking as reference the expression  $L^A$  (Henser *et al.*, 2005), where L is the number of levels and A corresponds to the number of attributes. Two alternatives were estimated, the relevant attributes and levels, a combination of 729 possible choices  $(3 \times 3 \times 3) \times (3 \times 3 \times 3)$  was obtained. To reduce the choice alternatives, an optimal orthogonal design was applied, 18 cards were obtained that were distributed in 3 blocks (block 1, block 2 and block 3) of 6 cards each, with 2 combination options: attributes and levels (Figure 1).

The conversion of the exchange rate in Option 1 price attribute was \$ 95.00 = 4.4 USD and in Option 2 it was \$ 78.0 = 2.75 USD (The exchange rate was \$ 21.8 Mexican pesos per US \$ 1) (Banxico, 2020).

y niveles pertinentes, se obtuvo una combinación de 729 posibles elecciones (3x3x3) x (3x3x3). Para reducir las alternativas de elección, se aplicó un diseño ortogonal óptimo, se obtuvieron 18 tarjetas que se distribuyeron en 3 bloques (bloque 1, bloque 2 y bloque 3) de 6 tarjetas cada uno, con 2 opciones de combinaciones: atributos y niveles (Figura 1).

The responses of the selection were recorded on a response sheet (Figure 2), the alternative of “no choice” was incorporated, its inclusion allows the participant to approach a real market situation, where on some occasions the products offered do not satisfy the customer, or they decide to postpone their choice (Louviere, 2001).

#### Experimentos de elección

Tarjeta 2	Opción 1	Opción 2
Marca		
	Fabricante	Bianca
Origen	Nacional	Internacional
Precio	\$95	\$78

BLOQUE 1

Figura 1. Diseño de tarjetas mostrada a los consumidores de acuerdo al bloque.

Figure 1. Card design shown to consumers according to block.

La conversión del tipo de cambio en el atributo precio Opción 1 fue \$95,00= 4,4USD y en la Opción 2 fue de \$78,0= 2,75USD (El tipo de cambio fue de \$21,8 pesos mexicanos por US\$1) (Banxico, 2020).

Las respuestas de la selección se anotaron en una hoja de respuestas (Figura 2), se incorporó la alternativa de “no elección”, su inclusión permite acercar al participante a una situación

#### Data collection

The application of the questionnaires was carried out during the months of January and February 2015. It was carried out in small groups (4 to 6 people) and individually. Participation was voluntary, they did not receive financial remuneration for collaborating and only those who stated that they consumed garlic were considered. All the participants



real de mercado, donde en algunas ocasiones los productos ofrecidos no satisfacen al consumidor o bien éstos deciden posponer su elección (Louviere, 2001).

were told about the sections of the questionnaire and what the choice experiment consisted of. In this way, a greater understanding of the process was ensured, since a verbal

**Experimento de elección**

Imagine que este día usted necesita comprar ajo fresco, para ello tendrá que acudir al lugar habitual donde lo adquiere y elegir el ajo fresco que compraría.

Se le mostrarán unas tarjetas donde vienen opciones de ajo. Cada opción tiene marca, origen y precio distintos.

En cada tarjeta, debe seleccionar el ajo fresco que compraría, si ninguna de las alternativas que se le ofrece le satisface, tiene la opción de no elegir ninguna de ellas.

**Características de la Tarjeta:**

**Marca:** El ajo fresco puede tener marca del fabricante, marca blanca o sin marca.

**Origen:** La procedencia del ajo fresco puede ser Internacional, nacional o regional (Ariظة)

**Precio:** El precio esta expresado en moneda nacional y es precio por kilogramo.

**De acuerdo a la selección realizada en las tarjetas marcar con una "X" la opción elegida.**

	Opción 1	Opción 2	Opción 3 <small>Ninguna de las anteriores</small>
Tarjeta 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tarjeta 2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tarjeta 3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tarjeta 4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tarjeta 5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tarjeta 6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Gracias por su colaboración.

---

Bloque 1

Figura 2. Diseño de hoja de respuestas

Figure 2. Answer sheet layout

**Recolección de datos**

La aplicación de los cuestionarios se llevó a cabo durante los meses de enero y febrero del 2015. Se realizó en grupos pequeños (de 4 a 6 personas) y de manera individual. La participación fue voluntaria, no recibieron remuneración económica por colaborar y sólo se consideraron aquéllos que manifestaron consumir ajo. A todos los participantes se les comentaban las secciones del cuestionario y se les explicaba en qué consistía el experimento de elección.

explanation was received and the instructions were subsequently read individually.

**Data analysis**

First, the NGene software was used. Once the information on the preferences of the individuals was obtained, a database was prepared. The information was analyzed in the Limdep software in the Nlogit module. A conditional *logit* model was estimated, which allows modeling the probability of an event occurring (in this case the choice). The model

De esta manera se aseguraba una mayor comprensión del proceso, ya que se recibía una explicación verbal y posteriormente de manera individual leían las instrucciones.

### Análisis de los datos

Primeramente, se utilizó el software NGene. Una vez obtenida la información sobre las preferencias de los individuos, se elaboró una base de datos. La información se analizó en el software Limdep en el módulo de Nlogit. Se procedió a la estimación de un modelo *logit* condicional, que permite modelizar la probabilidad que se produzca un evento (en este caso la elección). En el modelo se explica la utilidad que el consumidor  $n$  obtiene de la opción  $i$  ( $i$  = opción 1 u opción 2), el cual se define como:

$$U_n^i = \alpha_i + \beta_{1i} \text{MarcaFi} + \beta_{2i} \text{Smarcai} + \beta_{3i} \text{Inti} + \beta_{4i} \text{Regi} + \beta_{5i} \text{Pri} + \epsilon_{in}$$

Dónde:

$\alpha_i$  = constante específica para la alternativa  $i$  ( $i$  = Op1, Op2)

$\text{MarcaFi}$  = 1 si es marca del fabricante en la opción  $i$ ; -1 si es marca blanca; y 0 si es sin marca.

$\text{Smarcai}$  = 1 si es sin marca en la opción  $i$ ; -1 si es marca blanca; y 0 si es marca fabricante.

$\text{Inti}$  = 1 si es de origen internacional en la opción  $i$ ; -1 si es origen nacional; y 0 si es origen regional.

$\text{Regi}$  = 1 si es de origen regional en la opción  $i$ ; -1 si es origen nacional; y 0 si es origen internacional.

$\text{Pri}$  = 1 si es precio alto (\$95) en la opción  $i$ ; -1 si precio medio (\$78); y 0 si es precio bajo (\$60).

En esta especificación, todas las variables explicativas se introducen como efectos y por tanto, el coeficiente del nivel excluido como variable se

explains the utility that consumer  $n$  obtains from option  $i$  ( $i$  = option 1 or option 2), which is defined as:

$$U_n^i = \alpha_i + \beta_{1i} \text{MarcaFi} + \beta_{2i} \text{Smarcai} + \beta_{3i} \text{Inti} + \beta_{4i} \text{Regi} + \beta_{5i} \text{Pri} + \epsilon_{in}$$

Where:

$\alpha_i$  = specific constant for alternative  $i$  ( $i$  = Op1, Op2)

$\text{MarcaFi}$  = 1 if it is the manufacturer's brand in option  $i$ ; -1 if it is a white label; and 0 if it is unbranded.

$\text{Smarcai}$  = 1 if it is without a mark in option  $i$ ; -1 if it is a white label; and 0 if it is a manufacturer brand.

$\text{Inti}$  = 1 if it is of international origin in option  $i$ ; -1 if it is national origin; and 0 if it is regional origin.

$\text{Regi}$  = 1 if it is of regional origin in option  $i$ ; -1 if it is national origin; and 0 if it is international origin.

$\text{Pri}$  = 1 if it is a high price (\$ 95) in option  $i$ ; -1 if average price (\$ 78); and 0 if it is low price (\$ 60).

In this specification, all the explanatory variables are entered as effects and therefore, the coefficient of the excluded level as a variable can be obtained by changing the sign of the sum of the coefficients of the present levels (e.g.,  $\beta_{\text{Nac}} = -(\beta_{\text{INT}} + \beta_{\text{REG}})$ ). Option 3 corresponds to the "no choice", with null values in all variables. Specific constants are also included for each of the options.

To know the estimate of the economic valuation of consumers with respect to the attributes presented in the consumption situations, the marginal willingness to pay (DMP) was applied. The profits associated with the product attributes are obtained by separating the global assessments expressed by the respondents on the

puede obtener cambiando el signo de la suma de los coeficientes de los niveles presentes (e.g.,  $\beta_{Nac} = -(\beta_{INT} + \beta_{REG})$ ). La opción 3 corresponde a la “no elección”, con valores nulos en todas las variables. Se incluyen además constantes específicas para cada una de las opciones.

Para conocer la estimación de la valoración económica de los consumidores respecto a los atributos presentados en las situaciones de consumo, se aplicó la disposición marginal a pagar (DMP). Las utilidades asociadas a los atributos del producto se obtienen a través de la separación de las valoraciones globales expresadas por los encuestados sobre las situaciones de consumo presentadas. La función de utilidad se expresa como:  $U = U(Z_t)$ ; donde  $Z_t$  es el valor del atributo para la característica  $t$  de las posibilidades de elecciones que el consumidor pretende adquirir maximizando su utilidad, para lo cual comúnmente se usa una función de utilidad lineal (Greeny Srinivassan, 1978). La disposición marginal de pago, se calcula como el cociente invertido de signo entre el coeficiente del atributo a valorar y el coeficiente del precio, éste último siempre deberá estar valorado en unidades monetarias.

$$WTP = -\frac{\beta_i}{\beta_R}$$

## Resultados y discusión

### Preferencias de consumo

Los resultados muestran que el porcentaje de veces que se elige

consumption situations presented. The utility function is expressed as:  $U = U(Z_t)$ ; where  $Z_t$  is the value of the attribute for the characteristic  $t$  of the possibilities of choices that the consumer intends to acquire by maximizing his utility, for which a linear utility function is commonly used (Greeny Srinivassan, 1978). The marginal willingness to pay is calculated as the inverted quotient of sign between the coefficient of the attribute to value and the price coefficient, the latter must always be valued in monetary units.

$$WTP = -\frac{\beta_i}{\beta_R}$$

## Results and discussion

### Consumption preferences

The results show that the percentage of times that each alternative is chosen corresponds option 1un 36.5%, option 2un 61.1% and 1.8% no choice. The consumer mostly decides on one of the proposed consumption options. Although the option none or “no choice” is not significant, it suggests the convenience of presenting the respondent with the possibility of not choosing, which allows results closer to reality.

The results of the choice experiment show that the calculated likelihood ratio (LLR) is 2877.29 (p-value 0.0000), therefore, the model obtained is better compared to the model that only includes constants (Table 1). The specific constants are positive and significant, which implies

cada alternativa corresponde: opción 1 un 36,5%, opción 2 un 61,1% y un 1,8% no elección. El consumidor mayormente se decide por una de las opciones de consumo propuestas. A pesar que la opción ninguno o “no elección” es poco significativa, deja entrever la conveniencia de presentar al encuestado la posibilidad de no elegir, lo cual permite resultados más cercanos a la realidad.

Los resultados del experimento de elección muestran que la razón de verosimilitud (LLR) calculada es de 2877,29 (valor  $p < 0,0000$ ), por tanto, el modelo obtenido es mejor respecto al modelo que únicamente incluye constantes (cuadro 1). Las constantes específicas son positivas y significativas, lo que implica que las opciones que ofrecen productos hipotéticos aportan más utilidad que la opción de no elegir ninguna alternativa. A excepción de la variable asociada al ajo sin marca, el resto es individual y conjuntamente significativas.

Los parámetros estimados de las variables de marca revelan una demanda normal. El signo positivo del parámetro  $\beta$ , indica que la marca de fabricante incrementa la utilidad global de los consumidores y, por ende, la probabilidad de compra del producto aumenta. En el caso del nivel de coeficiente excluido  $\beta$ , que corresponde a marca blanca el signo de la variable es negativo, lo cual indica una disminución en la utilidad de los consumidores en el producto sin marca y un consiguiente descenso en la probabilidad de compra.

that the options that offer hypothetical products are more useful than the option of choosing no alternative. With the exception of the variable associated with unbranded garlic, the rest are individually and jointly significant.

The estimated parameters of the brand variables reveal a normal demand. The positive sign of the  $\beta$  parameter indicates that the manufacturer's brand increases the overall utility of consumers and, therefore, the probability of purchasing the product increases. In the case of the coefficient level excluding  $\beta$ , which corresponds to white brand, the sign of the variable is negative, which indicates a decrease in the utility of consumers in the unbranded product and a consequent decrease in the probability of purchase.

In relation to the origin, it is perceived that the utility of consumers increases when it comes to regional garlic. When garlic is of national origin, the consumer's utility also increases, but significantly less than when it comes to regional garlic. Regarding the origin, it is observed that the parameter of garlic of international origin is negative, which implies that the probability of choice by the consumer decreases when it has this characteristic. On the other hand, the estimated parameter for price reveals a normal distribution. The negative sign of the variable shows a decrease in the perceived utility of consumers and a consequent decrease in the probability of purchase (Table 1).

In general, consumer preferences are influenced by the brand, origin

**Cuadro1. Parámetros estimados en el modelo logit condicional básico en la muestra de consumidores.**

**Table1. Parameters estimated in the basic conditional logit model in the consumer sample.**

Variable	Coefficiente	Prob.
$\alpha_A$	7,48768650***	0,0000
$\alpha_B$	7,43678575***	0,0000
$\beta_{marcaF}$	0,57786778***	0,0000
$\beta_{Smarca}$	-0,06997966***	0,4764
$\beta_{Int}$	-0,47311209	0,0000
$\beta_{Reg}$	0,45624626	0,0000
$\beta_{Pr}$	-0,05609165***	
$\beta_{marcaB} = -(\beta_{marca+} \beta_{smarca})$	-0,5078881	
$\beta_{NAC} = -(\beta_{INT} + \beta_{REG})$	0,0168665	
Numero observaciones	1602	
LL(0)	-925,8037	
LL( $\theta$ )	512,84189	
LLR: $\chi^2_4$	2877,291	

Notas: LL(0): Logaritmo de la función de verosimilitud evaluada en un modelo donde se incluyen sólo las constantes. LL( $\theta$ ): Logaritmo de la función de verosimilitud evaluada en el modelo con todas las variables explicativas. LLR: Ratio de verosimilitud, entre el modelo donde se incluye sólo las constantes y el modelo básico LLR = -2[LL (0)-LL ( $\theta$ )]. LLR sigue una distribución X<sup>2</sup> con grados de libertad igual al número de coeficientes cuya significatividad conjunta se contrasta. El valor de probabilidad entre paréntesis. \*\*\* Indica significatividad al 1% de nivel de significación.

Notes: LL (0): Logarithm of the likelihood function evaluated in a model where only the constants are included. LL (q): Logarithm of the likelihood function evaluated in the model with all the explanatory variables. LLR: Likelihood ratio, between the model where only the constants are included and the basic model LLR = -2 [LL (0) -LL (q)]. LLR follows an X<sup>2</sup> distribution with degrees of freedom equal to the number of coefficients whose joint significance is tested. The probability value in parentheses. \*\*\* Indicates significance at the 1% level of significance.

En relación al origen, se percibe que la utilidad de los consumidores se incrementa cuando se trata de ajo con origen regional. Cuando el ajo es de origen nacional la utilidad del consumidor también aumenta, pero sensiblemente menos que cuando se trata de ajo regional. Respecto al

and price of the product, being favored those that have a manufacturer’s brand and those of regional origin, which is why it can be observed in consumers an inclination to acquire products with a recognized brand and the more familiar origin, while an increase in the price decreases the probability of purchase.

origen, se observa que el parámetro del ajo de origen internacional es negativo, lo que implica que la probabilidad de elección por parte del consumidor disminuye al poseer esta característica. Por otro lado, el parámetro estimado para el precio revela una distribución normal. El signo negativo de la variable, advierte una disminución en la utilidad percibida de los consumidores y un consecuente descenso en la probabilidad de compra (Cuadro 1).

En general, las preferencias de los consumidores están influidas por la marca, origen y precio del producto, siendo favorecidos aquellos que poseen marca de fabricante y los de origen regional, por lo que se puede observar en los consumidores una inclinación adquirir productos con marca reconocida y el origen más familiar, mientras que un incremento en el precio disminuye la probabilidad de compra.

#### **Disposición marginal a pagar (DMP)**

En cuanto a los resultados obtenidos de la DMP, se advierte que los consumidores estarían dispuestos a pagar un sobreprecio por un ajo fresco con marca del fabricante, la disposición marginal es de \$10,30. De manera opuesta en el ajo fresco con marca blanca o distribuidor se deberá considerar el otorgar un descuento de \$9,05 para incentivar su compra y en menor proporción en el ajo sin marca (\$1,25).

Respecto al origen, los consumidores expresaron estar dispuestos a pagar un sobreprecio de \$ 8,13 pesos por ajo fresco con

#### **Marginal willingness to pay (DMP)**

Regarding the results obtained from the DMP, it is noted that consumers would be willing to pay a premium for a fresh garlic with the manufacturer's brand, the marginal provision is \$ 10.30. On the contrary, in fresh garlic with private label or distributor, a discount of \$ 9.05 should be considered to encourage its purchase and to a lesser extent in garlic without brand (\$ 1.25).

Concerning origin, consumers expressed their willingness to pay a surcharge of \$ 8.13 pesos for fresh garlic with regional origin, in the case of national origin, although the marginal payment disposition is maintained, it is lower (\$ 0.30). On the contrary, in international origin, consumers would need a reduction of \$ 8.43 pesos to purchase it (Table 2).

Consumers would undoubtedly be willing to pay a premium for brand-endorsed products, particularly those of regional or national origin.

In general, the research findings show that the brand influences the consumer's purchase decision, results that are consistent with previous studies that indicate the brand as a differentiating attribute (Lassoued and Hoobs, 2015; Dumlupinar, 2006; Hoeffler and Keller, 2002). On the other hand, the origin has been identified as an important factor to consider when making a purchase decision, and particularly in the garlic from Arizpe. For consumers, origin is considered as a purchase decision criterion and information reference,

procedencia regional, en el caso de origen nacional aunque se mantiene la disposición marginal de pago esta es menor (\$0,30). Por el contrario, en el origen internacional los consumidores necesitarían una reducción de \$ 8,43 pesos para adquirirlo (Cuadro 2).

the results find incidence in various studies of origin as an indicator of value in the acquisition of products, as a source of information and a reference in manufacturing processes, among others (Pérez and Gracia, 2020; Quiñones *et al.*, 2018; Luceri *et*

**Cuadro 2. Disposición marginal al pago (DMP) por atributo por los consumidores.**

**Table 2. Marginal willingness to pay (DMP) by attribute by consumers.**

Atributo		DMP	Atributo		DMP
	Fabricante	\$10,30		Internacional	\$-8,43
Marca	Blanca	\$ -9,05	Origen	Nacional	\$ 0,30
	Sin marca	\$-1,25		Regional	\$ 8,13

Sin lugar a dudas, los consumidores estarían dispuestos a pagar un sobreprecio a los productos respaldados por una marca, particularmente en aquellos productos de origen regional o nacional.

En general, los hallazgos de la investigación muestran que la marca influye en la decisión de compra del consumidor, resultados que son coincidentes con trabajos previos que señalan la marca como un atributo diferenciador (Lassoued y Hoobs, 2015; Dumlupinar, 2006; Hoefler y Keller, 2002). Por otro lado, se ha identificado el origen como factor importante a considerar en la toma de decisión de compra, y particularmente en el ajo precedente de Arizpe. Para los consumidores el origen es considerado como criterio de decisión de compra y referente de información, los hallazgos encuentran incidencia en diversos estudios del origen como un indicador de valor en la adquisición de

*al.*, 2016; Díaz and García, 2014). This attribute helps agri-food companies to compete in the markets (Agarwal and Barone, 2005).

**Conclusions**

The results of the choice experiment identified consumer preferences for branded and regionally sourced garlic when purchasing fresh garlic. It is observed that the preferences are oriented towards those products that have a manufacturer’s brand and have a regional origin, identifying among consumers a tendency to acquire products with a recognized brand and of a known, more familiar origin.

Regarding the price, although in general terms there is an inverse relationship with the demand, that if the price is higher the demand decreases, the truth is that the consumers would be willing to pay a premium if the products present



productos, como fuente de información y referente en procesos de elaboración, entre otros (Pérez y Gracia, 2020; Quiñones *et al.*, 2018; Luceri *et al.*, 2016; Díaz y García, 2014). Dicho atributo coadyuva a las empresas agroalimentarias para competir en los mercados (Agarwal y Barone, 2005).

## Conclusiones

Los resultados del experimento de elección identificaron las preferencias del consumidor hacia el ajo con marca y de origen regional, al momento de comprar ajo fresco. Se observa que las preferencias se orientan hacia aquellos productos que poseen marca de fabricante y tienen un origen regional, identificándose entre los consumidores una tendencia a adquirir productos con marca reconocida y de un origen conocido, más familiar.

En cuanto al precio, aunque en términos generales existe una relación inversa con la demanda, es decir que a mayor precio decrece la demanda, lo cierto es que, los consumidores estarían dispuestos a pagar un sobreprecio si los productos presentan el atributo de marca regional o nacional. Sin embargo, la disposición marginal hacia la marca regional es superior a la nacional. Esta información deja entrever la posibilidad que existe para los pequeños productores de la región objeto de estudio de posicionarse en el mercado a través de una marca de ajo regional, tomando en cuenta que la producción de ajo constituye una actividad vital para sus pobladores, es un cultivo estratégico y tradicional.

the attribute of regional brand or national. However, the marginal disposition towards the regional brand is higher than the national one. This information suggests the possibility that exists for small producers in the region under study to position themselves in the market through a regional garlic brand, considering that garlic production constitutes a vital activity for its inhabitants, it is a strategic and traditional cultivation.

This revaluation of local and regional products by the consumer, leads to promote rural economic development. Finally, this research allowed us to know the attitude towards the brand of an agri-food product such as Arizpe garlic. Although a direct vision of consumers is obtained, the truth is that not including all the agents participating in the purchase - sale of the product limits a comprehensive vision, which could be considered a future line of research, as well as the analyze the age of the brand with the origin and

---

### *End of English Version*

---

Esta revalorización de productos locales y regionales por parte del consumidor, conlleva a impulsar el desarrollo económico rural. Finalmente, esta investigación permitió conocer la actitud hacia la marca de un producto agroalimentario como el ajo de Arizpe. Si bien, se obtiene una visión directa de los consumidores, lo cierto es que el no incluir a todos los agentes participantes en la compra – venta del producto, limita una visión

integral, lo cual podría considerarse una línea de investigación futura, así como el analizar la antigüedad de la marca con el origen y precio (Baumert y De Obesso, 2021).

esp. estud. agrosoc. pesq. 246:117-142.

Chávez, M. 2010. Ajo. Guía técnica para el área de influencia del campo experimental costa de Hermosillo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-SAGARPA: 77-111.

## Literatura citada

Chávez, C.M. Valenzuela, C., Fierros, G.A. y Maldonado, LA. 2008. Efecto de métodos y densidades de siembra en la producción de dos variedades de ajo jaspeado en la sierra baja de Sonora. XI Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali, Baja California: 381-385.

Díaz, C. y García, I. 2014. La mirada sociológica hacia la alimentación: análisis crítico del desarrollo de la investigación en el campo alimentario. *Polít. soc. (Madr., Internet)*. 51:15-49.

Dumlupinar, B. 2006. Market commoditization of product and services. *Review of social, Economic & Business Studies*, 4 (2): 145-151.

FAOSTAT. 2019. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado en Febrero de 2014, de Faostat Domains Producción / Cultivos: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>

Green, P. y Srinivasan, V. 1978. Conjoint analysis in consumer research: issues and outlook. *Journal Consumer Research*, 5: 103-123.

Henser, D., Rose, J. y Greene, W. 2005. *Applied Choice Analysis*. New Yor: Cambridge University Press .

Hoeffler, S. y Keller, K. 2002. Building brand equity through corporate societal marketing. *Journal of Public Policy & Marketing*, 21 (1): 78-89.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía 2015. Cuéntame, información por entidad. Disponible en: [http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/son/territorio/div\\_municipal.aspx?tema=me&e=26](http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/son/territorio/div_municipal.aspx?tema=me&e=26). Fecha de consulta: octubre de 2020.

Lagerkvist, C., Berthelsen, T., Sundström, K. y Johansson, H. 2014. Country of origin or EU/non-EU labelling of

Agarwal, S. y Barone, M. J. 2005. Emerging issues for geographical indication branding strategies. MATRIC Research Papers, Midwest Agribusiness Trade Research and Information Center, Iowa State University. Disponible en: [https://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1007&context=matric\\_researchpapers](https://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1007&context=matric_researchpapers)

Agudelo, M., Cesín, A. E. y Ramírez, B. 2019. Evaluación y análisis sensorial del Queso Bola de Ocosingo (México) desde la perspectiva del consumidor. *Rev. mex. de cienc. pecuarias*. 10(1): 104-119. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v10i1.4739>.

Álvarez, A. A., P. Valenzuela C., J. López E. y J. Ávila S. 2007. Comportamiento de diez culti-vares de ajo (*Allium sativum* L.) en la costa de Hermosillo con riego rodado. En Memorias de 2do. Seminario-Demostración: Tecnologías en la producción de ajo en la Sierra de Sonora. Universidad de Sonora-INIFAP- Fundación Produce Sonora: 13-20.

Banxico, 2020. Tipo de cambio. Recuperado en octubre del 2020 en: <https://www.banxico.org.mx>

Baumert T. y De Obesso, M.M. 2021. Brand antiquity and value perception: Are customers willing to pay higher prices for older brands?. *J. of Business Research*, 123:241-254.

Bechtold, K. y Abdulai, A. 2014. Combining attitudinal statements with choice experiments to analyze preference heterogeneity for functional dairy products . *Food Policy*, 47: 97-106.

Castillo, E., Santoyo, H., Muñoz, M. y Rodríguez, B. 2017. Indicaciones geograficas de productos agroalimentarios en México. *Rev.*

- beef? Comparing structural reliability and validity of discrete choice experiments for measurement of consumer preferences for origin and extrinsic quality cues. *Food Quality and Preference*, 34: 60-61.
- Lassoued, R. y Hobbs, J. 2015. Consumer confidence in credence attributes: The role of brand trust. *Food Policy*, 15: 99-107.
- Louviere, J. 2001. Choice experiments: an overview of concepts and issues. En J. Bennet & R. Blamey, *The Choice Modelling Approach to Environmental Valuation* (pp. 1-36). Ed. Edward Elgar Publishing Limited.
- Luceri, B., Latusi, S. y Zerbini, C. 2016. Product versus region of origin: which wins in consumer persuasion?. *British Food Journal*, 118 (9): 2157-2170.
- Macías-Duarte, R., Grijalva-Contreras, R. y Robles-Contreras, F. 2010. Productividad y calidad de variedades de ajo (*Allium sativum* L.) bajo condiciones desérticas en Caborca, Sonora, *Biotecnia*, 12 (1): 44.
- Otero, J. 2015. Valorización de productos agroalimentarios locales para el desarrollo rural: Reflexiones sobre dos experiencias Argentinas. *Agroalimentaria*, 21(41): 71-80.
- Pérez, L. y Gracia, A. 2020. Intención de compra de aceite de oliva con denominación de origen protegida: el aceite del Bajo Aragón. *ITEA-Información Técnica Económica Agraria*, 116(1): 57-70. Disponible en: <https://doi.org/10.12706/itea.2019.018>.
- Prochile. 2019. Oficina Comercial de Prochile en Ciudad de México: Estudio de mercado ajos en México. Obtenido de *Horticultura Internacional AgriFoodGateway*. Disponible en: <https://hortintl.cals.ncsu.edu/es/articulos/estudio-de-mercado-ajos-en-m-xico>. Fecha de consulta: octubre de 2019.
- Profeta, A., Balling, R. y Roosen, J. 2012. The relevance of origin information at the point of sale. *Food Quality and Preference*, 26: 1-11.
- Quiñones, X., Forster, H., Penker, M., Belletti, G. M., Scaramuzzi, S., B. K. y Altenbuchner, C. 2018. How are food Geographical Indications evolving? – An analysis of EU GI amendments. *British Food Journal*, 120 (8): 1876-1887. Available in: <https://doi.org/10.1108/BFJ-02-2018-0087>.
- Sabori, R., Fierros, G., Valenzuela, L., Maldonado, L. y Chávez, M. 2007. Evaluación de la producción y calidad de variedades de ajo en riego por goteo. *En memorias del 2do. Seminario Demostración: Tecnologías en la producción de ajo en la Sierra de Sonora*. Sonora: Universidad de Sonora-INIFAP-Fundación Produce Sonora: 7-14.
- Scozzafava, G., Casini, L. y Contini, C. 2014. Analysis of Italian consumer preferences for beef. *New Medit*, 1: 66-72.
- SIAP. 2020. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Obtenido de *Cierre estadístico de la producción agrícola 2019*. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. Fecha de consulta: mayo de 2020.