

2021  
38:4



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

Octubre-Diciembre



**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 bananás**  
Vianel Rodríguez

### Biometría

Angel Gómez  
Jorge Ortega  
Belkis Bracho  
Colyos Colmenares

**Fito protección**  
Mauro Albarracín

Nelly Delgado

José V. Lasso

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

**Ferrocultivara**  
Eduardo Chinea  
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

Universidad Centrocidental Lisandro  
Alvarado, Venezuela, Venezuela

Universidad del Zulia, Venezuela  
Universidad del Zulia, Venezuela  
Universidad del Zulia, Venezuela  
Universidad del Zulia, Venezuela

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

Universidad del Zulia, Venezuela  
Universidad del Zulia, Venezuela  
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

# Revista de la Facultad de Agronomía Universidad del Zulia (Venezuela). Desde 1968 https://www.produccioncientificafuz.org/index.php/agronomia

### 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. liliuardaneta@hotmail.com  
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

MSc. Rosalva 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

### Biocientología 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

Universidad Central de Venezuela,  
Venezuela

Ramon Jaime  
Mercedes de Serpa

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

Universidad de los Andes, Venezuela

**Socioeconomía y sistemas de producción**  
María Elena Peña  
Eduardo Delgado

Universidad del Zulia, Venezuela  
Instituto Nacional de Investigaciones  
Agrícolas - Barinas, Venezuela  
Universidad Nacional Experimental  
Rafael María Barón, Venezuela

Isneira Huerta

Universidad del Zulia, Venezuela  
Universidad Autónoma de la Laguna,  
México

María Alexandra Alizo  
Miguel Crespo

Universidad Autónoma de la Laguna,  
México

### Suelos

Pedro Betancourt  
Nestor Noguera  
Stalin Torres

Instituto Nacional de Investigaciones  
Agrícolas - Lara, Venezuela  
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 4. Octubre-Diciembre, 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, Octubre-Diciembre 2021 Vol 38 Número 4. Págs. 751-1133.

## Índice

---

### Producción Vegetal, Plant Production

---

**Infecciones quiescentes por *Colletotrichum gloeosporioides* en las diferentes etapas de desarrollo del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) en dos épocas de producción**

Quiescent infections by *Colletotrichum gloeosporioides* in the different development stages of the guava fruit (*Psidium guajava* L.) in two production seasons

Clemencia Guédez y Dorian Rodríguez

751-770

**Calibración *in situ* de dos sondas FDR bajo condiciones de suelo salino en el hiperárido de Chile**

*In situ* calibration of two FDR gauges under saline soil conditions in the hyperarid of Chile

Cristián Kremer Fariña, Rodrigo Candia Antich, Ian Homer Bannister y Oscar Seguel Seguel

771-784

**Discriminación de malezas basada en la respuesta espectral del cultivo de maíz, Manabí, Ecuador**

Weed discrimination based on the spectral response of the corn crop, Manabí, Ecuador

Cinthya K. Pinargote Intriago y Henry A. Pacheco Gil

785-805

**Fertilización foliar con selenito de sodio y su efecto sobre el rendimiento y calidad nutracéutica en el cultivo de vid**

Foliar fertilization of sodium selenite and its effects on yield and nutraceutical quality in grapevine

María de los Ángeles Sariñana-Navarrete, Luis Guillermo Hernández-Montiel, Esteban Sánchez-Chavez, Juan José Reyes Perez, Bernardo Murillo-Amador, Arturo Reyes-González, Pablo Preciado-Rangel

806-824

**Uso potencial de *Lupinus exaltatus* Zucc. (Leguminosae) como abono verde en suelos de Jalisco, México**

Potential use of *Lupinus exaltatus* Zucc. (Leguminosae) as green manure in soils of Jalisco, Mexico

Juan Francisco Zamora Natera e Isidro Zapata Hernández

825-845

**Características biométricas de los cereales forrajes de invierno cultivados bajo fertilización con nitrógeno en condiciones de lluvia templada**

Biometric characteristics of winter forage cereals grown under nitrogen fertilization in temperate rain

Muhammad Jamil, Muhammad Ansar, Zammurad Iqbal Ahmed, Tanveer Ahmed, Muhammad Shehzad, Aqeel Ahmad y Imran Mahmood

846-866

**Antagonismo de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre aislados de *Fusarium* spp. procedentes de *Nicotiana tabacum***

Antagonism of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* on isolates of *Fusarium* spp. from *Nicotiana tabacum*

Wilson Geobel Ceiro-Catasú, Yusel Vega-González, María Eulalia Taco-Sánchez, Ramiro Remigio Gaibor-Fernández, Oandis Sosa-Sánchez

867-886

**Susceptibilidad de *Diaphorina citri* a dimetoato y clorpirifos en huertas cítricas comerciales de Veracruz, México**

Susceptibility of *Diaphorina citri* to dimethoate and chlorpyrifos in commercial citrus orchards of Veracruz, Mexico

Sherell Zamora Juárez, Daniel Arturo Rodríguez- Lagunes, Francisco Osorio-Acosta, Odón Castañeda-Castro, Rosalía Núñez-Pastrana, Juan Carlos Noa-Carrazana

887-901

**Crecimiento de cuatro tipos de *Capsicum* spp. en sustratos bajo ambiente protegido**

Growth of four types of *Capsicum* spp. in substrates under a protected environment

Francisco Higinio Ruiz-Espinoza, Juan Carlos Rodríguez-Ortiz, Félix Alfredo Beltrán-Morales y Fernando de Jesús Carballo-Méndez

902-912

**Bacterias con actividad antifúngica asociadas a *Ocimum basilicum* L.**

*Ocimum basilicum* L. associated bacteria with antifungal activity

Pablo Misael Arce-Amezquita, Mirella Romero-Bastidas y Maurilia Rojas-Contreras

913-933

**Macrofauna edáfica y propiedades físico-químicas del suelo, en fincas cafetaleras de pequeños agricultores**

Edaphic macrofauna and soil physicochemical properties, in smallholder coffee farms

Eli Morales Rojas, Segundo Chavez Quintana, Elder Chichipe Vela, Manuel Oliva y Lenin Quiñones Huatangari

934-950

**Caracterización de bacterias rizosféricas aisladas de suelo cultivado con caña de azúcar en el estado de Tamaulipas, México**

Characterization of rhizospheric bacteria isolated from soil cultivated with sugarcane in Tamaulipas state, Mexico

Jesús Gerardo García Olivares, Martín Abraham Reyes Lara, Juan Flores Gracia, Jesús Di Carlo Quiroz Velásquez, Israel García León, José Reyes Hernández y Homar Rene Gill Langarica

951-969

**Caracterización del complejo genético tracrARN-DRARN asociado al sistema CRISPR-Cas9 del fitosimbionte *Acholeplasma palmae* descriptor: interés biotecnológico**

Characterization of the tracrARN-DRARN genetic complex associated with the CRISPR-Cas9 system of the phytosymbiont *Acholeplasma palmae*: biotechnological interest

Luis Moncayo, Alex Castro, Diego Arcos, Paulo Centanaro, Diego Vaca, Cristina Maldonado, Aleivi Perez, Carla Lossada, Lenin González-Paz

970-992

---

**Producción Animal, Animal Production**

---

**Efecto del estrés anisomótico sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides ovinos**

Effect of anisotonic stress on the structural and functional integrity of the plasma and acrosomal membrane of ram sperm

Jorge Rubio-Guillén, Carla Osorio-Meléndez, Decio González-Villalobos, Héctor Nava-Trujillo, Armando Quintero-Moreno

993-1015

**Respuesta bioquímica e inmune en tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*) con suplementación de quitosano en dieta**

Biochemical and immune response in red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*) with dietary chitosan supplementation

Yuniel Méndez-Martínez, Ginger K. Pacheco-Morales, Karla A. Del Barco-Ibarra, Yenny G. Torres-Navarrete, Martha P. Hernández-Vergara

1016-1034

---

**Tecnología de Alimentos, Food Technology**

---

**Adición de hierbas aromáticas en la elaboración de una bebida carbonatada a base de maracuyá**

Adding aromatic herbs in the elaboration of a carbonated drink based on passion fruit

Rubén Fabricio Cedeño Barre y Wagner Antonio Gorozabel Muñoz

1035-1053

**Influencia del amaranto y semillas de melón en la composición nutricional de una barra energética**

Influence of amaranth and melon seeds on the nutritional composition of an energy bar

Ángel Zambrano Loor, José Muñoz Murillo y Cecilia Párraga Álava

**1054-1068**

**Cinética del secado de las hojas de las especies *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) y *Melampodium divaricatum* (Asteraceae)**

Leaves drying kinetics of the species *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) and *Melampodium divaricatum* (Asteraceae)

Enrique Ruiz Reyes, Ricardo Baquerizo-Crespo, Michael Aníbal Macías Pro, María José Pin Molina y Yesther Marisol Pita Gavilanes

**1069-1086**

---

**Socioeconomía, Socioeconomics**

---

**Willingness to pay and consumer preferences for organic lettuce (*Lactuca sativa* L)**

Disposición a pagar y preferencias por lechugas orgánicas (*Lactuca sativa* L)

Arcadio A. Cerda, Leidy Y. García, Angela I. Viscay y Beatriz M. López

**1087-1107**

**The price elasticity of the demand and revenue increase for some Mexican planting seeds**

La elasticidad precio de la demanda e ingresos para algunas semillas mexicanas

Sergio Orozco Cirilo, Juan Manuel Vargas Canales, Sergio Ernesto Medina Cuéllar y Nicasio García Melchor



**1108-1133**

## **Infecciones quiescentes por *Colletotrichum gloeosporioides* en las diferentes etapas de desarrollo del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) en dos épocas de producción**

Quiescent infections by *Colletotrichum gloeosporioides* in the different development stages of the guava fruit (*Psidium guajava* L.) in two production seasons

Infecções quiescentes por *Colletotrichum gloeosporioides* nos diferentes estágios de desenvolvimento da goiaba (*Psidium guajava* L.) em duas épocas de produção

Clemencia Guédez<sup>1\*</sup> y Dorian Rodríguez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico “Carlos Díaz Polanco”, Universidad de Los Andes, Núcleo Rafael Rangel, Trujillo, Venezuela. Código postal: 3150. Correo electrónico: [clemencia.guedez@gmail.com](mailto:clemencia.guedez@gmail.com), . <sup>2</sup>Postgrado de Fitopatología, Agronomía, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”. Cabudare, Lara, Venezuela. Código postal: 3023. Correo electrónico: [dorianalcides@gmail.com](mailto:dorianalcides@gmail.com), .

### **Resumen**

El hongo *Colletotrichum gloeosporioides* es causante de la antracnosis, una de las enfermedades postcosecha *más importante en frutos de guayaba*. Con el objetivo de detectar infecciones quiescentes causadas por este patógeno en yemas florales (YF) y frutos de guayaba en dos épocas de producción, se seleccionaron trece plantas y cincuenta YF por planta organizadas bajo un diseño en bloques al azar con tres tratamientos: YF cubiertas inoculadas, YF cubiertas no inoculadas y YF descubiertas no inoculadas (testigo). Se inocularon semanalmente diez YF con 3 mL de suspensión conidial de *C. gloeosporioides* por YF, identificadas con cintas de colores.semana<sup>-1</sup>.fecha<sup>-1</sup>. Transcurrida una semana de la inoculación se recolectaron cinco YF por tratamiento, se trasladaron al laboratorio donde fueron lavadas, desinfectadas, incubadas en cámara húmeda y sembradas en el medio PDA para detectar la presencia del hongo, las cinco YF restantes quedaron en la planta hasta la cosecha. Las infecciones quiescentes se manifestaron en todas las

Recibido: 24-08-2020 • Aceptado: 22-04-2021.

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [clemencia.guedez@gmail.com](mailto:clemencia.guedez@gmail.com)



etapas de desarrollo del fruto, con mayor incidencia entre las 6 y 13 semanas con diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre infecciones por semanas. El hongo se desarrolló con mayor incidencia en cámara húmeda (69,79 %) con apariencia de una masa mucilaginosa anaranjada y en PDA (51 %) con presencia de crecimiento micelial. La época de producción fue determinante en la detección de infecciones quiescentes, con mayor porcentaje entre abril y agosto (69,10 %) cuando se presentaron. Estos resultados demuestran que *C. gloeosporioides* infecta las flores y frutos inmaduros de guayaba y la enfermedad se manifiesta en frutos maduros. **Palabras clave:** antracnosis, infecciones latentes, yemas florales, frutos inmaduros.

## Abstract

The fungus *Colletotrichum gloeosporioides* is the cause of anthracnose, one of the most important postharvest diseases in guava fruits. The objective of detect quiescent infections caused by this pathogen in flower buds (YF) and guava fruits in two production seasons, thirteen plants and fifty YF per plant were selected, organized under a randomized block design with three treatments: YF inoculated covers, YF covered not inoculated and YF uncovered not inoculated (control). Ten YF were inoculated weekly with 3 mL of conidial suspension of *C. gloeosporioides* by YF and were identified with colored ribbons.  $\text{week}^{-1}.\text{date}^{-1}$ . One week after the inoculation, five YF were collected per treatment, which were transferred to the laboratory where they were washed, disinfected, incubated in a humid chamber and sown in the PDA medium, to detect the presence of the fungus, the remaining five YF were left in the plant until harvest. Quiescent infections manifested in reproductive organs of all ages, with the highest incidence between 6 and 13 weeks with significant differences ( $p < 0.001$ ) between infections/weeks. The fungus developed more frequently in the humid chamber (69.79 %) with the appearance of an orange mucilaginous mass and in the PDA (51 %) with the presence mycelial growth. The production season was decisive in the detection of quiescent infections, with the highest percentage between april and august (69.10 %) when the highest rainfall occurred. These results demonstrated that *C. gloeosporioides* infects guava flowers and unripe fruits and the disease manifests itself in ripe fruits.

**Keywords:** anthracnose, latent infections, flower buds, unripe fruits.

## Resumo

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* é o causador da antracnose, uma das mais importantes doenças pós-colheita da goiaba. Para detectar infecções quiescentes por esse patógeno em botões de flores (YF) e goiaba em duas safras, foram selecionadas treze plantas e cinquenta YF por planta, dispostas em blocos ao acaso com três tratamentos: YF coberto inoculado, YF coberto não inoculado e descoberto YF descoberto (controle). Dez YF foram inoculados semanalmente

com 3 mL de suspensão de conídios de *C. gloeosporioides* por YF, identificados com fitas coloridas. Semana<sup>-1</sup>.data<sup>-1</sup>. Após uma semana de inoculação, cinco YF foram coletados para seu tratamento, transferidos para o laboratório de onde foram lavados, desinfetados, incubados em câmara úmida e semeados no meio do PDA, para detecção da presença do fungo, os cinco restantes foram plantados YF na planta de colheita. As infecções inativas manifestaram-se em todas as fases de desenvolvimento dos frutos, com maior incidência entre 6 e 13 semanas, com diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) entre infecções<sup>-1</sup>.semanas<sup>-1</sup>. O fungo se desenvolveu com maior incidência em câmara úmida (69,79 %) com aparecimento de massa mucilaginosa alaranjada e em PDA (51 %) com presença de crescimento micelial. O período de produção foi decisivo na detecção das infecções inativas, com maior percentual entre abril e agosto (69,10%) quando ocorreram. Estes resultados mostram que *C. gloeosporioides* infecta flores e frutos imaturos de goiaba e a doença se manifesta em frutos maduros.

**Palavras-chave:** antracnose, infecções latentes, botões florais, frutos imaturos.

## Introducción

La guayaba (*Psidium guajava* L.) se encuentra entre las diez frutas más importantes en Venezuela, y se consume como fruta fresca y procesada (Aular y Casares, 2011). Esta fruta es afectada por enfermedades postcosecha que representan un grave problema porque reducen la calidad y la cantidad de frutas para su comercialización, lo que genera pérdidas económicas.

*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., es uno de los principales hongos que afectan a los frutos de guayaba en postcosecha debido a la severidad del daño que ocasiona (Cannon *et al.*, 2012; Phoulivong *et al.*, 2010). Las especies de *Colletotrichum* son consideradas patógenos quiescentes de gran importancia que causan la enfermedad de la antracnosis en una amplia gama de hospederos en regiones tropicales (Junqueira *et al.*, 2004; Piccinin *et*

## Introduction

Guava (*Psidium guajava* L.) is among the ten most important fruits in Venezuela, and is consumed as fresh and processed fruit (Aular and Casares, 2011). This fruit is affected by post-harvest diseases that represent a serious problem because they reduce the quality and quantity of fruits for commercialization, which generates economic losses.

*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., is one of the main fungi affecting guava fruits in postharvest due to severity of damage it causes (Cannon *et al.*, 2012; Phoulivong *et al.*, 2010). *Colletotrichum* species are highly important quiescent pathogens that cause anthracnose disease in a wide range of hosts in tropical regions (Junqueira *et al.*, 2004; Piccinin *et al.*, 2005). Latent or quiescent infections in fruits caused by this fungus manifest after harvest, this inactivity of the fungus can last

*al.*, 2005). Las infecciones latentes o quiescentes en frutos causadas por este hongo se manifiestan después de la cosecha, esta inactividad del hongo puede durar meses y manifestarse en el momento de la madurez del fruto (Prusky *et al.*, 2006; Adikaram *et al.*, 2015).

Este hongo afecta a los frutos de guayaba en sus diferentes estados fenológicos, permaneciendo quiescentes por largos períodos de tiempo dentro del tejido hasta que los frutos están próximos a la maduración, momento en el cual comienzan a manifestarse los síntomas, los cuales se caracterizan por lesiones circulares y oscuras, que en condiciones de alta humedad pueden estar acompañadas de una masa mucilaginosa de esporas de color anaranjada (Soares *et al.*, 2008; Moraes *et al.*, 2015).

El proceso de infección de estos hongos comienza inmediatamente después que los conidios se adhieren y germinan en el epicarpio o cutícula del fruto, el tubo germinativo desarrolla un apresorio que emite una punta de infección que rompe y penetra la cutícula del fruto inmaduro y posterior a la penetración permanece inactiva durante meses hasta la maduración del fruto. En estos casos, el evento de penetración del hongo puede pasar desapercibido por el hospedero o al contrario puede provocar en el fruto una respuesta de defensa rápida que resulta en la inducción de moléculas de defensa que limitarán el avance de la infección (Prusky y Lichter, 2007).

El tiempo que transcurre entre la inactividad de la infección de *C. gloeosporioides* en frutos inmaduros

for months and manifest itself at the time of fruit maturity (Prusky *et al.*, 2006; Adikaram *et al.*, 2015).

This fungus affects guava fruits in their different phenological stages, remaining quiescent for long periods of time within the tissue until the fruits are close to maturation, at which time the symptoms begin to appear, which are characterized by lesions. circular and dark, which in high humidity conditions may be accompanied by a mucilaginous mass of orange spores (Soares *et al.*, 2008; Moraes *et al.*, 2015).

The infection process of these fungi begins immediately after the conidia adhere and germinate in the epicarp or cuticle of the fruit, the germ tube develops an appressorium that emits a point of infection that breaks and penetrates the cuticle of the immature fruit and subsequent to the penetration remains inactive for months until fruit ripening. In these cases, the penetration event of the fungus may go unnoticed by the host or, on the contrary, it may provoke a rapid defense response in the fruit that results in the induction of defense molecules that will limit progression of the infection (Prusky and Lichter, 2007).

The time that elapses between the inactivity of *C. gloeosporioides* infection in immature fruits until activation in mature fruits is due to physiological and biochemical changes that occur during ripening that are detected by the pathogen (Prusky and Lichter, 2007; Adikaram *et al.*, 2015).

Quiescence may be due to several factors: (i) nutritional differences

hasta la activación en frutos maduros es debido a cambios fisiológicos y bioquímicos que ocurren durante la maduración que es detectada por el patógeno (Prusky y Lichter, 2007; Adikaram *et al.*, 2015).

La quiescencia puede deberse a varios factores: (i) diferencias nutricionales entre el fruto inmaduro y el fruto maduro con respecto al desarrollo del hongo; (ii) cambios metabólicos asociados con la maduración y alteraciones en el patrón de respiración del fruto; (iii) deficiencia en el hongo de enzimas pectinolíticas para invadir frutos inmaduros, (iv) presencia de compuestos tóxicos en frutos inmaduros que no se encuentran en frutos maduros (Adikaram *et al.*, 2015). Romero *et al.* (2017), sostienen que la detección de infecciones latentes en frutos de olivo (*Olea europaea* subsp. *europaea* L.) es útil para la toma de decisiones en el manejo de la enfermedad antes de la aparición de los primeros síntomas.

La detección de las infecciones quiescentes en frutos de guayaba es de gran importancia para determinar el momento de aplicar el control, debido a que es un evento que pasa desapercibido al examen visual en campo y se manifiesta en frutos maduros con las consecuentes pérdidas económicas para los productores, por lo que el objetivo de esta investigación fue determinar en qué etapa del desarrollo del fruto se inicia la infección por *C. gloeosporioides* en guayaba (*Psidium guajava* L.) en dos épocas de producción.

between the immature fruit and the mature fruit with respect to the development of the fungus; (ii) metabolic changes associated with ripening and alterations in the respiration pattern of the fruit; (iii) deficiency in the fungus of pectinolytic enzymes to invade immature fruits, (iv) presence of toxic compounds in immature fruits that are not found in mature fruits (Adikaram *et al.*, 2015). Romero *et al.* (2017), argue that the detection of latent infections in olive fruits (*Olea europaea* subsp. *europaea* L.) is useful for making decisions in the management of the disease before the appearance of the first symptoms.

The detection of quiescent infections in guava fruits is of great importance to determine the moment to apply the control, because it is an event that goes unnoticed on visual examination in the field and manifests itself in mature fruits with the consequent economic losses for the producers, so the objective of this research was to determine at what stage of fruit development the infection by *C. gloeosporioides* begins in guava (*Psidium guajava* L.) in two production seasons.

## Materials and methods

### Experiment location

The study was carried out in a guava plantation located in the Baralt municipality, state of Zulia, Venezuela (09°36'02"N, 70°58'33"W), with a rainfall of 1,320 mm, a temperature of 27 °C and relative humidity of 77 % annual average (Sánchez *et al.*, 2009). Quiescent infections were determined

## Materiales y métodos

### Ubicación del ensayo

El estudio se realizó en una plantación de guayabo ubicada en el municipio Baralt, estado Zulia, Venezuela (09°36'02" N, 70°58'33" O), con una precipitación de 1.320 mm, temperatura de 27 °C y humedad relativa de 77 % promedio anual (Sánchez *et al.*, 2009). Las infecciones quiescentes se determinaron en dos épocas de mayor producción de frutos de guayaba en la zona, de septiembre a diciembre del primer año y de abril a agosto del segundo año. La plantación de 13 años de edad, produce frutos de guayaba tipo Criolla Roja, con meso y endocarpio rojo, establecida a una distancia entre planta y entre hileras de 7 m x 7 m.

### Patógeno y preparación del inóculo

El hongo *C. gloeosporioides* se obtuvo de frutos de guayaba con síntomas de antracnosis procedentes de la plantación, y actualmente integra la colección de hongos del laboratorio de fitopatología y control biológico "Dr. Carlos Díaz Polanco, Núcleo Rafael Rangel de la Universidad de los Andes. El inóculo se preparó a partir del hongo incubado en cajas de Petri con medio de cultivo PDA por 12 días, agregando agua destilada estéril (ADE) y a través de un raspado con espátula de vidrio se removió el micelio con los conidios, la suspensión resultante se filtró a través de doble capa de gasa estéril, y utilizando la cámara de Neubauer se ajustó a la concentración de  $1.10^6$  conidios.mL<sup>-1</sup> con ADE.

in two seasons with the highest production of guava fruits in the area, from September to December of the first year and from April to August of the second year. The 13-year-old plantation produces guava fruits of the Criolla Roja type, with red meso and endocarp, established at a distance between plants and between rows of 7 m x 7 m.

### Pathogen and inoculum preparation

The fungus *C. gloeosporioides* was obtained from guava fruits with anthracnose symptoms from the plantation, and is currently part of the fungus collection of the "Dr. Carlos Díaz Polanco, Rafael Rangel Nucleus of the Universidad de los Andes. The inoculum was prepared from the fungus incubated in Petri dishes with PDA culture medium for 12 days, adding sterile distilled water (ADE) and through scraping with a glass spatula, the mycelium with the conidia was removed, the resulting suspension was filtered through a double layer of sterile gauze, and using the Neubauer chamber, the concentration of 1,106 conidia.mL<sup>-1</sup> was adjusted with ADE.

### Vegetal material

Thirteen trees with a high number of flowers and stage 1 flower buds were selected, based on their appearance and uniform size, in each plant 50 flower buds were chosen, of which 35 were covered with white paper bags attached to the branch in the top with tape and 15 remained uncovered labeled with tape. The number of flower buds selected was greater than that used for each treatment due to the risk of their fall. The classification

### Material vegetal

Se seleccionaron 13 árboles con un alto número de flores y yemas florales estadio 1, basados en su apariencia y tamaño uniforme, en cada planta se eligieron 50 yemas florales, de las cuales 35 se cubrieron con bolsas de papel blanco sujetas a la rama en la parte superior con cinta pegante y 15 permanecieron descubiertas rotuladas con una cinta. El número de yemas florales seleccionadas fue mayor al utilizado para cada tratamiento por el riesgo de caída de las mismas. La clasificación de los estados fenológicos del fruto de la guayaba se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Laguado *et al.* (2002); y para esta investigación se incluyeron desde yemas florales hasta frutos maduros.

### Inoculación de flores y cada estado fenológico del fruto

La selección de las yemas florales se realizó a comienzo de la floración, se marcaron y/o cubrieron las que conformarían los tratamientos (YF, flores, frutillos y frutos cubiertos inoculados, YF, flores, frutillos y frutos cubiertos no inoculados y YF, flores, frutillos y frutos descubiertos no inoculados). La primera inoculación de las yemas florales se realizó una semana después de la selección de éstas, aplicando 3 mL de la suspensión conidial del hongo por yema floral utilizando un atomizador manual de 200 mL. Las inoculaciones se realizaron por 15 semanas y cada semana se inocularon 10 yemas florales o frutos (tratamiento YF o frutos cubiertos inoculados). Asimismo, se seleccionaron y marcaron 10 YF o frutos cubiertos no inoculados y 10 YF o frutos descubiertos no inoculados.

of the phenological states of the guava fruit was carried out according to the methodology proposed by Laguado *et al.* (2002); and for this research, from flower buds to mature fruits were included.

### Inoculation of flowers and each phenological state of the fruit

The selection of flower buds was carried out at the beginning of flowering, those that would make up the treatments were marked and/or covered (YF, flowers, inoculated covered fruits, YF, flowers, non-inoculated covered fruits and fruits and YF, flowers, fruits and uncovered fruits not inoculated). The first inoculation of the flower buds was carried out one week after their selection, applying 3 mL of the conidial suspension of the fungus per flower bud using a 200 mL manual atomizer. The inoculations were carried out for 15 weeks and each week 10 flower buds or fruits were inoculated (YF treatment or inoculated covered fruits). Likewise, 10 YF or non-inoculated covered fruits and 10 YF or uncovered non-inoculated fruits were selected and marked.

Seven days after each inoculation, 5 flower buds or fruits were collected from each of the treatments for a total of 15, placed in plastic bags and taken to the laboratory for incubation. The same number of flower buds or fruits per treatment were left on the plant until harvest (week 16), to determine the incidence and severity of the disease.

### Sample processing

The flower buds, berries and fruits collected were taken to the laboratory

Siete días después de cada inoculación se recolectaron 5 yemas florales o frutos de cada uno de los tratamientos para un total de 15, colocadas en bolsas plásticas y llevadas al laboratorio para su incubación. Igual número de yemas florales o frutos por tratamiento fueron dejados en la planta hasta la cosecha (semana 16), para determinar la incidencia y la severidad de la enfermedad.

### Procesamiento de muestras

Las yemas florales, frutillos y frutos recolectados fueron llevados al laboratorio en bolsas plásticas, se lavaron con agua corriente por 5 min, se desinfectaron por inmersión en hipoclorito de sodio al 3 % por 2 min, luego se lavaron con agua destilada estéril (ADE) y secaron con papel absorbente estéril. De las cinco yemas florales o frutos cosechados cada semana, dos se dividieron longitudinalmente en cuatro partes, de cada cuadrante se tomaron secciones de epicarpio de 4 x 4 mm, aproximadamente, y se colocaron en cajas de Petri con PDA, se incubaron hasta que aparecieron las colonias características de *C. gloeosporioides*, que fueron identificadas utilizando las claves de Barnett y Hunter (1986) y Hyde *et al.* (2009); igualmente se colocaron tres yemas florales o frutos en cámara húmeda (contenedor de aluminio de 15 cm x 10 cm con papel absorbente humedecido) hasta observar las estructuras del hongo; ambas evaluaciones bajo condiciones de temperatura ambiente ( $27\text{ }^{\circ}\text{C} \approx 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), 12 horas luz

in plastic bags, washed with running water for 5 min, disinfected by immersion in 3 % sodium hypochlorite for 2 min, then washed with sterile distilled water (ADE) and blotted with sterile absorbent paper. Of the five flower buds or fruits harvested each week, two were divided longitudinally into four parts, from each quadrant epicarp sections of approximately 4 x 4 mm were taken and placed in Petri dishes with PDA, they were incubated until they appeared. the characteristic colonies of *C. gloeosporioides*, which were identified using the keys of Barnett and Hunter (1986) and Hyde *et al.* (2009); likewise, three flower buds or fruits were placed in a humid chamber (aluminum container of 15 cm x 10 cm with moistened absorbent paper) until the structures of the fungus were observed; both evaluations under ambient temperature conditions ( $27\text{ }^{\circ}\text{C} \approx 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), 12 hours light and 12 hours dark. Daily evaluations were carried out until the presence of signs of the fungus was detected, which made it possible to determine the presence of quiescent infections.

The fruits left on the plant each week were collected in their entirety at 16 weeks, harvesting fruits from one week to 16 weeks of inoculation, they were transferred to the laboratory, immersed in a 2 % hypochlorite solution, for 3 min, washed under running water, air dried and placed in a dry place on cardboard sheets. Observations to determine the presence of characteristic symptoms or signs of the disease were made daily for 10 days.

y 12 horas oscuridad. Se realizaron evaluaciones diarias hasta detectar la presencia de signos del hongo que permitieron determinar la presencia de infecciones quiescentes.

Los frutos dejados en la planta cada semana, fueron recolectados en su totalidad a las 16 semanas, cosechando frutos de una semana hasta 16 semanas de inoculación, fueron trasladados al laboratorio, sumergidos en una solución de hipoclorito al 2 %, por 3 min, lavados con agua corriente, secados al aire y colocados en un lugar seco sobre láminas de cartón. Las observaciones para determinar la presencia de síntomas o signos característicos de la enfermedad se realizaron diariamente por 10 días.

### **Análisis estadístico**

El estudio en campo se realizó bajo un diseño de bloques al azar, con tres tratamientos: yemas florales cubiertas inoculadas, yemas florales cubiertas no inoculadas y yemas florales descubiertas no inoculadas (testigo), con 10 repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue cada estado fenológico del fruto de guayaba.

Las infecciones quiescentes se determinaron por el número yemas, flores, frutillos o frutos con presencia de signos (masa mucilaginosa en frutos inmaduros) en cámara húmeda o crecimiento micelial en PDA. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de medias Tukey entre los tratamientos, con el programa estadístico SPSS 19 para Windows (IBM Corporación Released, 2010).

### **Statistical analysis**

The field study was carried out under a randomized block design, with three treatments: inoculated covered flower buds, non-inoculated covered flower buds and non-inoculated exposed flower buds (control), with 10 repetitions per treatment, the experimental unit was each state phenological of the guava fruit.

Quiescent infections were determined by the number of buds, flowers, berries or fruits with the presence of signs (mucilaginous mass in immature fruits) in a humid chamber or mycelial growth in PDA. The data were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and Tukey's mean test between treatments, with the statistical program SPSS 19 for Windows (IBM Corporation Released, 2010).

### **Results and discussion**

#### **Quiescent infections in different phenological stages of the fruit**

A greater presence of quiescent infections was evidenced in green fruits aged between 6 and 13 weeks, with infection values from 58.33 to 77.72 % in the entire green fruit stage (figure 1), with significant differences ( $p < 0.001$ ) between infections per weeks. These observations correspond to stages I and II, between 42 and 91 days, and according to the growth dynamics of the "Criolla Roja" type guava fruit proposed by Laguado *et al.* (2002), stages I and II range from 7 to 91 days, with rapid fruit growth kinetics in stage I that notably decreases in stage II.



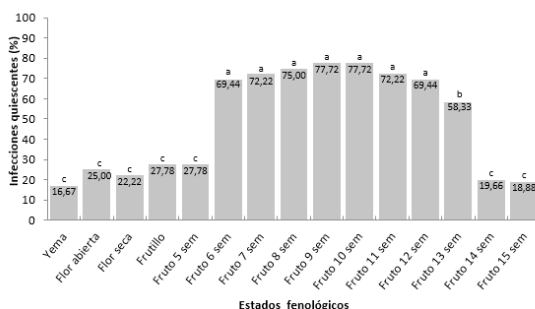
## Resultados y discusión

### Infecciones quiescentes en diferentes estados fenológicos del fruto

Se evidenció mayor presencia de infecciones quiescentes en los frutos verdes con edades comprendidas entre las 6 y 13 semanas, con valores de infección desde 58,33 a 77,72 % en toda la etapa de fruto verde (figura 1), con diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre infecciones por semanas. Estas observaciones corresponden con las etapas I y II, entre los 42 y 91 días, y según la dinámica de crecimiento del fruto de guayaba tipo “Criolla Roja” propuesta por Laguado *et al.* (2002), la etapa I y II abarca desde los 7 hasta 91 días, con una cinética de crecimiento rápido del fruto en la etapa I que disminuye notablemente en la etapa II.

Infections by *C. gloeosporioides* appeared from the flower buds (16.67 %) (figure 1) and throughout the growth phase of the guava fruit, as well as postharvest, which indicates that pathogen control strategies should start before flowering in order to eliminate the inoculum that survives in mummified leaves, branches and fruits. Fischer *et al.* (2017), pointed out that due to the wide distribution of quiescent infections in fruits that start from flowering, preventive management should be implemented considering disease monitoring and the elimination of residues from the previous harvest.

The incidence percentage of quiescent infections was higher for the inoculated covered flower buds treatment with 81 %, followed by the bare flower buds and non-inoculated



**Figura 1. Porcentaje de infección por *Colletotrichum gloeosporioides* en diferentes etapas de desarrollo del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) en el municipio Baralt, estado Zulia, Venezuela. Medias con letras diferentes presentan diferencias significativas según Tukey (T).**

**Figure 1. Percentage of infection by *Colletotrichum gloeosporioides* in different stages of development of the guava fruit (*Psidium guajava* L.) in the Baralt municipality, state of Zulia, Venezuela. Means with different letters present significant differences according to Tukey (T).**

Las infecciones por *C. gloeosporioides* aparecieron desde las yemas florales (16,67 %) (figura 1) y a lo largo de la fase de crecimiento del fruto de guayaba, así como en postcosecha, lo que indica que las estrategias de control del patógeno deben comenzar antes de la floración con la finalidad de eliminar el inóculo que sobrevive en hojas, ramas y frutos momificados. Fischer *et al.* (2017), señalaron que debido a la amplia distribución de infecciones quiescentes en frutos que se inician desde la floración, debe implementarse un manejo preventivo considerando un monitoreo de la enfermedad y la eliminación de residuos de la cosecha anterior.

El porcentaje de incidencia de infecciones quiescentes fue mayor para el tratamiento yemas florales cubiertas inoculadas con un 81 %, seguido de los tratamientos yemas florales descubiertas y yemas florales cubiertas no inoculadas con un 54 % y 46 %, respectivamente (figura 2). La presencia de infecciones quiescentes en yemas florales y frutos verdes que no fueron inoculados indica que posiblemente fueron infectados al inicio de su formación, o por el inóculo que pudo estar presente en las hojas y tallos que se cubrieron con las bolsas junto a las yemas.

Estos resultados coinciden con lo expresado por Michailides *et al.* (2010), quienes reportan que la incidencia de las enfermedades postcosecha depende de la presencia de infecciones quiescentes que se inician en campo, de la presencia de propágulos del hongo durante el desarrollo del fruto, de la eficacia de los tratamientos

covered flower buds with 54 % and 46 %, respectively (Figure 2). The presence of quiescent infections in flower buds and green fruits that were not inoculated indicates that they were possibly infected at the beginning of their formation, or because of the inoculum that could be present in the leaves and stems that were covered with the bags next to the buds.

These results coincide with those expressed by Michailides *et al.* (2010), who report that the incidence of postharvest diseases depends on the presence of quiescent infections that start in the field, the presence of propagules of the fungus during fruit development, the effectiveness of postharvest treatments and the conditions storage and marketing. Therefore, it can be said that the high incidence of anthracnose disease in ripe guava fruits is due to early infection in flowers and immature fruits, so monitoring of the disease and elimination of harvest residues should be considered (Fischer *et al.*, 2017).

Soares *et al.* (2008) indicated that quiescent infections have epidemiological importance because they occur in different phenological stages of the fruit in the field and lead to an increase in infection in mature fruit in pre-harvest and post-harvest. Likewise, Moraes *et al.* (2013) found that *Colletotrichum* species infected guavas in different phenological stages in the absence of wounds, remaining quiescent before maturation.

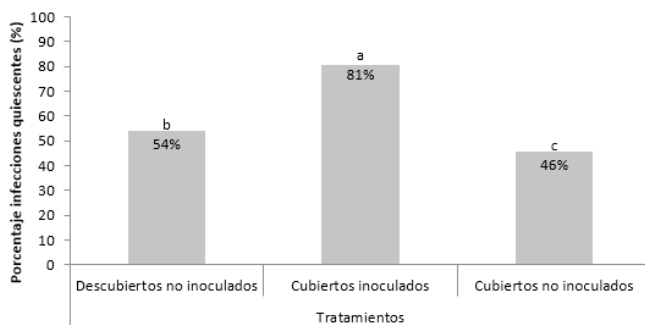
Moraes *et al.* (2015) found that *C. gloeosporioides* has the ability to survive in immature guava fruits at

postcosecha y de las condiciones de almacenamiento y comercialización. Por tanto, se puede decir que la alta incidencia de la enfermedad antracnosis en frutos maduros de guayaba, se debe a la infección temprana en flores y frutos inmaduros por lo que debe considerarse el monitoreo de la enfermedad y la eliminación de residuos de cosecha (Fischer *et al.*, 2017).

different ages of 10, 35, 60, 85 and 110 days after petal fall with conidia germination and appressor formation higher than 80 %.

### Incubation methods

Quiescent infections in flowers and fruits manifested after 16 days of incubation in a humid chamber, through the signs of the pathogen



**Figura 2.** Porcentaje de infección de *Colletotrichum gloeosporioides* en las diferentes etapas de desarrollo del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) para los diferentes tratamientos durante 16 semanas de evaluación, en el municipio Baralt, estado Zulia, Venezuela. Medias con letras diferentes presentan diferencias significativas según Tukey (T).

**Figure 2.** Percentage of *Colletotrichum gloeosporioides* infection in the different development stages of the guava fruit (*Psidium guajava* L.) for the different treatments during 16 weeks of evaluation, in the Baralt municipality, state of Zulia, Venezuela. Means with different letters present significant differences according to Tukey (T).

Soares *et al.* (2008) indicaron que las infecciones quiescentes tienen importancia epidemiológica porque ocurren en diferentes estados fenológicos del fruto en campo y conllevan al aumento de la infección

corresponding to a mucilaginous mass of orange or salmon color in the epicarp of the reproductive organ (figure 3), as well as to the evidence of mycelial growth from the fruit tissues after three days of incubation in the

en el fruto maduro en precosecha y postcosecha. Así mismo, Moraes *et al.* (2013) encontraron que las especies de *Colletotrichum* infectaron guayabas en diferentes estados fenológicos en ausencia de heridas permaneciendo quiescente antes de la maduración.

Moraes *et al.* (2015) encontraron que *C. gloeosporioides* tiene la habilidad de sobrevivir en frutos inmaduros de guayaba en diferentes edades de 10, 35, 60, 85 y 110 días después de la caída de los pétalos con una germinación de conidios y formación de apresorios superior al 80 %.

### Métodos de incubación

Las infecciones quiescentes en flores y frutos se manifestaron después de 16 días de incubación en cámara húmeda, a través de los signos del patógeno correspondiente a una masa mucilaginosa de color anaranjado o salmón en el epicarpio del órgano reproductivo (figura 3), así como a la evidencia de crecimiento micelial a partir de los tejidos del fruto después de tres días de incubación en el medio de cultivo PDA. El tiempo de observación del patógeno depende de las condiciones de incubación y posiblemente está relacionado a la interacción patógeno-flores/fruto o patogénesis. En los frutos el patógeno después de la penetración al tejido, lo coloniza y se reproduce para luego manifestarse en una masa de conidios de color naranja debido a las condiciones de alta humedad, como modo de sobrevivencia, y por tratarse del fruto completo tarda varios días

PDA culture medium. The observation time of the pathogen depends on the incubation conditions and is possibly related to the pathogen-flower/fruit interaction or pathogenesis. In the fruits, the pathogen, after penetrating the tissue, colonizes it and reproduces itself and then manifests itself in a mass of orange conidia due to high humidity conditions, as a way of survival, and because it is the complete fruit, it takes several days in colonizing plant material; while in the culture medium the structures of the fungus come into direct contact with the nutrients and the growth is rapid and visible.

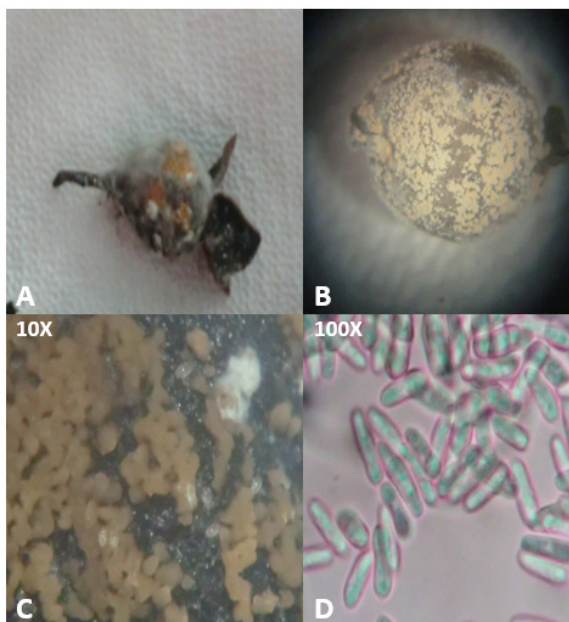
The method of incubation of flower buds and green fruits played a very important role in the detection of quiescent infections, 69.79 % of flower buds and fruits presented quiescent infections in a humid chamber and 51 % when they were incubated in culture medium PDA (figure 4). Fischer *et al.* (2017), detected a 93 % incidence of *Colletotrichum* in immature guava fruits in a humid chamber after the ninth day of incubation. The high percentage of reproductive structures of the fungus in a humid chamber is possibly due to the fact that the entire flower bud or fruit was incubated, while only sections of the plant material were sown in PDA culture medium, so that the quiescent infection point could not have been in the sections of the vegetable that came into contact with the growing medium.

### Field study

In the plantation, no "anthracnose" symptoms were manifested during the stage from flower buds to 16-week-old

en colonizar el material vegetal; mientras que en el medio de cultivo las estructuras del hongo entran en contacto directo con los nutrientes y el crecimiento es rápido y visible.

fruits, at harvest time, however, the disease was observed in guava fruits stored after harvest in all treatments, confirming that the pathogen was present in the plantation and the



**Figura 3. Frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) de 7(A) y 10(B) semanas de edad con presencia de una masa mucilaginosa de color salmón sobre el epicarpio (A, B y C). Conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* proveniente de la masa mucilaginosa (D).**

**Figure 3. Guava fruits (*Psidium guajava* L.) 7 (A) and 10 (B) weeks old with the presence of a salmon-colored mucilaginous mass on the epicarp (A, B and C). *Colletotrichum gloeosporioides* conidia from the mucilaginous mass (D).**

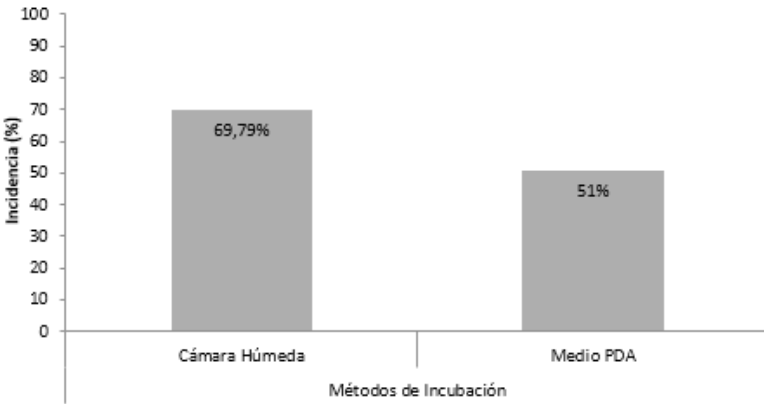
El método de incubación de yemas florales y frutos verdes jugó un papel muy importante en la detección de infecciones quiescentes, el 69,79 % de las yemas florales y frutos presentaron infecciones quiescentes en cámara húmeda y el 51 % cuando se incubaron

infection possibly occurred in the early stages of fruit development, remaining inactive or quiescent until ripening.

These results coincide with previous studies carried out by Prusky *et al.* (2013), who pointed out

en medio de cultivo PDA (figura 4). Fischer *et al.* (2017), detectaron un 93 % de incidencia de *Colletotrichum* en frutos de guayaba inmaduros en cámara húmeda después del noveno día de incubación. El alto porcentaje de estructuras reproductivas del hongo en cámara húmeda, posiblemente se debe a que se incubó la yema floral o fruto completo, mientras que en medio de cultivo PDA sólo se sembró secciones del material vegetal, por lo que el punto de infección quiescente pudo no haber estado en las secciones del vegetal que entró en contacto con el medio de cultivo.

that *C. gloeosporioides* has the ability to infect immature avocado fruits (*Persea americana* L.) in the field, which remains quiescent until its activation at maturity and manifests as dark spots on ripe fruits. Quiescent infections by *C. gloeosporioides* can be the product of stress or natural defenses of the tomato fruit (González *et al.* 2013; Alkan *et al.* 2015); and when the physiological (maturity) and biochemical (presence of sugars) conditions of the guava fruit change, the activation of the pathogen and progression of the disease occur (Bruce Da Silva and Michereff, 2013).



**Figura 4.** Porcentaje de infecciones causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* en todos los estados fenológicos: YF, flores, frutillos y frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) incubados en cámara húmeda y medio de cultivo PDA, municipio Baralt, estado Zulia, Venezuela.

**Figure 4.** Percentage of infections caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in all phenological stages: YF, flowers, berries and guava fruits (*Psidium guajava* L.) incubated in a humid chamber and PDA culture medium, Baralt municipality, state of Zulia, Venezuela.

### Estudio en campo

En la plantación no se manifestaron síntomas de “antracnosis” durante la etapa comprendida desde yemas florales hasta frutos de 16 semanas de edad, momento de la cosecha, sin embargo, la enfermedad se observó en frutos de guayaba almacenados después de la cosecha en todos los tratamientos, lo que confirma que el patógeno estaba presente en la plantación y la infección ocurrió posiblemente en etapas tempranas del desarrollo del fruto, permaneciendo inactiva o quiescente hasta la maduración.

Estos resultados coinciden con estudios previos realizados por Prusky *et al.* (2013), quienes señalaron que *C. gloeosporioides* tiene la capacidad de infectar frutos de aguacate (*Persea americana* L.) inmaduros en campo, el cual permanece quiescente hasta su activación en la madurez y se manifiesta como manchas oscuras en frutos maduros. Las infecciones quiescentes por *C. gloeosporioides* pueden ser producto de estrés o defensas naturales del fruto de tomate (González *et al.* 2013; Alkan *et al.* 2015); y cuando cambian las condiciones fisiológicas (madurez) y bioquímicas (presencia de azúcares) del fruto de guayaba, se produce la activación del patógeno y avance de la enfermedad (Bruce Da Silva y Michereff, 2013).

### Época de producción

La época de producción influyó en la presencia de infecciones quiescentes en todos los estados fenológicos evaluados ( $p < 0,001$ ) con un 69,10 % en la época de abril-agosto y un

### Production season

The production season influenced the presence of quiescent infections in all the phenological stages evaluated ( $p < 0.001$ ) with 69.10 % in the April-August period and 15.14 % in the September-December period (figure 5). This result is due to the fact that in the April-August period there was greater precipitation, which suggests that the fungus used liquid water for its dispersion and germination of the conidia. This has already been demonstrated in avocado, in which they found that conidia of *Colletotrichum* sp. survived during the winter on green leaves and branches, which led to a greater infection in the field, manifesting itself in mature fruits with a high incidence of the disease (Sharma *et al.*, 2017). Likewise, Bruce Da Silva and Michereff (2013) indicated that the main source of inoculum are the conidia of *Colletotrichum* spp. that survive on branches and leaves; and in conditions of high humidity they are dispersed to the immature fruits through splashes of rainwater.

The main means of dissemination of *C. gloeosporioides* is through the splashing and dragging of the conidia to other organs of the plant by raindrops, causing new infections, which represents a favorable condition for the fungus, which has been evidenced in fruit trees such as mango (*Mangifera indica* L.) and blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) (Huerta *et al.*, 2009; López *et al.*, 2013). Conidia of *C. gloeosporioides* are spread mainly by raindrops, causing new infections; It is common for this fungus to infect

15,14 % en la época de septiembre-diciembre (figura 5). Este resultado se debe a que en la época de abril-agosto hubo mayor precipitación, lo que sugiere que el hongo utilizó el agua líquida para su dispersión y germinación de los conidios. Esto ya ha sido demostrado en aguacate, en los cuales encontraron que conidios de *Colletotrichum* sp. sobrevivieron durante el invierno en hojas y ramas verdes que conllevó a una mayor infección en campo manifestándose en frutos maduros con alta incidencia de la enfermedad (Sharma *et al.*, 2017). Así mismo, Bruce Da Silva y Michereff (2013) indicaron que la principal fuente de inóculo son los conidios de *Colletotrichum* spp. que sobreviven en ramas y hojas; y en condiciones de alta humedad se dispersan a los frutos inmaduros a través de salpicaduras de agua de lluvia.

El principal medio de diseminación de *C. gloeosporioides* es a través del salpique y arrastre de los conidios a otros órganos de la planta por gotas de lluvia, causando nuevas infecciones, lo cual representa una condición favorable para el hongo, que se ha evidenciado en frutales como el mango (*Mangifera indica* L.) y la mora (*Rubus glaucus* Benth.) (Huerta *et al.*, 2009; López *et al.*, 2013). Los conidios de *C. gloeosporioides* se diseminan principalmente por gotas de lluvia, lo que causa nuevas infecciones; es común que este hongo infecte frutos inmaduros en plantaciones y permanezca inactivo hasta después de la cosecha, activándose durante la maduración (Agrios, 2005).

immature fruits in plantations and to remain inactive until after harvest, activating during ripening (Agrios, 2005).

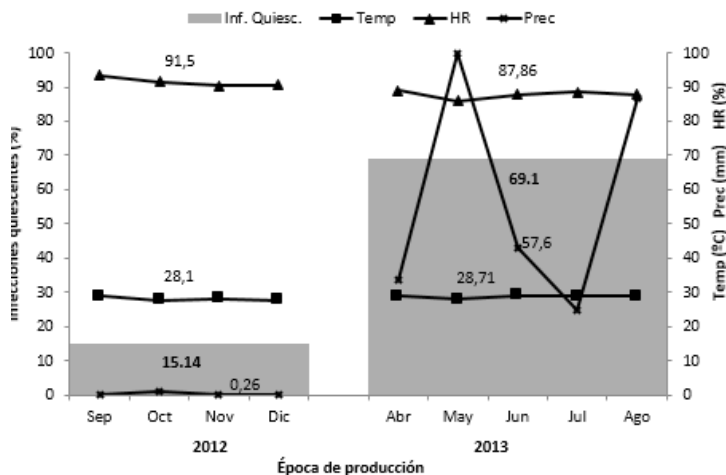
The average temperature in both seasons was higher than 28 °C and humidity exceeded 87 %, optimal environmental conditions for infection by *Colletotrichum* in guava fruits. This coincides with Ventura and Hinz (2002) who indicated that the optimal conditions for the growth and sporulation of *Colletotrichum musae* in banana fruits (*Musa* spp.) Were between 27 and 30 °C. In contrast to the results obtained, Barkai (2001) found that the effect of temperature (higher than 26 °C) is very important in the development of the disease in tropical fruits, being the most limiting variable in the infection process of *C. gloeosporioides* in fruits of milky (*Carica papaya* L.), mango (*Mangifera indica* L.) and guava (*Psidium guajava* L.), which depends on the development phase of the disease, being susceptible between the germination phase of the conidia and the tissue penetration phase.

## Conclusions

Quiescent *Colletotrichum gloeosporioides* infections were detected in all the phenological stages evaluated: buds, flowers, berries and guava fruits, with a higher incidence in green fruits aged 6 to 13 weeks, after an incubation period of 4 days in PDA médium and 15 days in a humid chamber.

The guava production season was a determining factor in detecting





**Figura 5.** Porcentaje promedio de infecciones quiescentes de *Colletotrichum gloeosporioides* en los estados fenológicos (yemas, flores, frutillos y frutos) evaluados y el promedio mensual de la temperatura y la humedad relativa en las dos épocas de producción, municipio Baralt, estado Zulia, Venezuela. Temp.=Temperatura; Prec.= Precipitación; HR= Humedad relativa.

**Figure 5.** Average percentage of quiescent infections of *Colletotrichum gloeosporioides* in the phenological stages (buds, flowers, berries and fruits) evaluated and the monthly average of temperature and relative humidity in the two production seasons, Baralt municipality, state of Zulia, Venezuela. Temp. = Temperature; Prec = Precipitation; RH = Relative humidity.

El promedio de temperatura en ambas épocas fue superior a los 28 °C y la humedad superó el 87 %, condiciones ambientales óptimas para la infección por *Colletotrichum* en frutos de guayaba. Lo cual coincide con Ventura y Hinz (2002) quienes señalaron que las condiciones óptimas para el crecimiento y esporulación de *Colletotrichum musae* en frutos de banana (*Musa* spp.) estuvieron entre 27 y 30 °C. En contraste con

a higher presence of quiescent infections, and corresponded with the time of greatest rainfall.

### *End of English Version*

los resultados obtenidos, Barkai (2001) encontró que el efecto de la temperatura (superior a 26 °C) es muy importante en el desarrollo de la enfermedad en frutos tropicales, siendo la variable más limitante en el proceso

de infección de *C. gloeosporioides* en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.), mango (*Mangifera indica* L.) y guayaba (*Psidium guajava* L.), lo cual depende de la fase de desarrollo de la enfermedad, siendo susceptible entre la fase de germinación de los conidios y la fase de penetración al tejido.

## Conclusiones

Las infecciones quiescentes de *Colletotrichum gloeosporioides* se detectaron en todos los estados fenológicos evaluados: yemas, flores, frutillos y frutos de guayaba, con mayor incidencia en frutos verdes con edades entre 6 a 13 semanas, luego de un período de incubación de 4 días en medio PDA y 15 días en cámara húmeda.

La época de producción de guayaba fue un factor determinante para detectar mayor presencia de infecciones quiescentes, y correspondió con la época de mayor precipitación.

## Literatura citada

Adikaram, N., Ch. Karunayake, G. Sinniah, I. Komala-Vithanage and D. Yakandawala. 2015. Fungal quiescence in fruit: an attempt to avoid toxic substances?. *J. Mycopathol. Res.* 53(1): 1-7.

Agrios, G. 2005. *Plant Pathology*. 5th Edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam, 952 p.

Alkan, N., G. Friedlander, D. Ment, D. Prusky and R. Fluhr. 2015. Simultaneous transcriptome analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* and tomato fruits response reveals novel fungal-fruit arm and defense strategies. *New Phytologist*. 205(2): 801-815.

Aular, J. y M. Casares. 2011. Consideraciones sobre la producción de frutas en Venezuela. *Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal*. 33: 187-198.

Barkai, R. 2001. *Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables*. Edit. Elsevier Science BV. 394 p.

Barnett, H. and B. Hunter. 1986. *Ilustred genera of imperfect fungi*. Burgess Publishing Company. Minnesota, USA. 241 p.

Bruce Da Silva, C. and S. Michereff. 2013. Biology of *Colletotrichum* spp. and epidemiology of the anthracnose in tropical fruit trees. *Rev. Catinga*. 26(4): 130-138.

Cannon, P., U. Damm, P. Johnston and B. Weir. 2012. *Colletotrichum* – Current status and future directions. *Stud. Mycol.* 73: 81–213.

Fischer, I., A. Soares, M. Arruda and L. Amorim. 2017. Temporal progress and spatial patterns of quiescent diseases in guava influenced by sanitation practices. *Scientia Agric.* 74(1): 68-76.

González, G., M. Ansorena, G. Viacava, S. Roura and J. Ayala-Zavala. 2013. Plant essential oils as antifungal treatments on the postharvest of fruit and vegetables. p. 429-446. *In: Mehdi Razzaghiand Mahendra Rai* (Eds). *Antifungal metabolites from plants*. Academic Edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Huerta, G., F. Holguín, J. Benítez y J. Toledo. 2009. Epidemiología de la antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.] en mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 27(2): 93-105.

Hyde, K., L. Cai, P. Cannon, J. Crouch, P. Crous, U. Damm, P. Johnston, Z. Liu, E. McKenzie, H. Prihastuti, R. Shivas, P. Taylor, B. Weir, Y. Yang and K. Zhang. 2009. *Colletotrichum*-names in current use. *Fungal Diversity*. 39: 147-183.

- IBM Corporación Released. 2010. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, IBM Corp., NY.
- Junqueira, N., R. Da Costa, A. Carneiro, V. Vargas, J. Peixoto e L. Junqueira. 2004. Efeito do óleo de soja no controle da antracnose e na conservação da manga cv. Palmer em pós-colheita. Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal. 26(2): 222-225.
- Laguado, N., M. Marín, L. Arenas, F. Araujo, C. Castro y A. Rincón. 2002. Crecimiento del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) del tipo Criolla Roja. Rev. Fac. Agron. (LUZ).19: 273-283.
- López, J., J. Castaño, M. Marulanda y A. López. 2013. Caracterización de la resistencia a la antracnosis causada por *Glomerella cingulata* y productividad de cinco genotipos de mora (*Rubus glaucus* Benth.) Acta Agron. 62(2): 174-185.
- Michailides, T., D. Morgan and Y. Luo. 2010. Epidemiological assessments and postharvest disease incidence (Chapter 6). 2: 69-88. In: D. Prusky and M.L. Gullino (Eds). Postharvest Pathology in the 21<sup>st</sup> Century.
- Moraes, S., T. Osama, A. Francisco, N. Sidnei and N. Massola. 2013. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). Rev. Bras. Frutic. 35(2): 657-664.
- Moraes, S., M. Escanferla and N. Massola. 2015. Prepenetration and penetration of *Colletotrichum gloeosporioides* into guava fruit (*Psidium guajava* L.): effects of temperature, wetness period and fruit age. J. Phytopathol.163: 149-159.
- Piccinin, E., S. Pascholati e R. Di Piero. 2005. Guava diseases: Doenças da goiabeira (*Psidium guajava* L.). p. 401-405. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A., eds. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4ed. Ceres, São Paulo, SP, Brazil.
- Phoulivong, S., L. Cai, H. Chen, E. McKenzie, K. Abdelsalam, E. Chukeatirote and K. Hyde. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. Fungal Diversity. 44: 33-43.
- Prusky, D., I. Kobiler, M. Akerman and I. Miyara. 2006. Effect of acidic solutions and acidic prochloraz on the control of postharvest decay caused by *Alternaria alternata* in mango and persimmon fruits. Postharvest Biol. Technol. 42: 134-41.
- Prusky, D. and A. Lichter. 2007. Activation of quiescent infections by postharvest pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage. Microbiol. Lett. 268: 1-8.
- Prusky, D., N. Alkan, T. Mengiste and R. Fluhr. 2013. Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. Annu. Rev. Phytopathol. 51: 155-176.
- Romero, J., C. Agusti, A. Trapero and A. Santa Barbara. 2017. Detection of latent infections caused by *Colletotrichum* sp. in olive fruit. J. Appl. Microbiol. 124(1): 1-15.
- Sánchez, A., E. Suárez, M. González, Y. Amaya, C. Colmenares y J. Ortega. 2009. Efecto del ácido indolbutírico sobre el enraizamiento de acodos aéreos de guayabo (*Psidium guajava* L.) en el municipio Baralt, Venezuela. Evaluación preliminar. Revista UDO Agrícola. 9 (1): 113-120.
- Sharma, G., M. Maymon and S. Freeman. 2017. Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. Sci. Rep. 7: 1-16.
- Silva, C. y S. Michereff. 2013. Biology of *Colletotrichum* spp. and epidemiology of the anthracnose in tropical fruit trees. Rev. Caatinga. 26: 130-138.
- Soares, A., S. Lourenco and L. Amorim. 2008. Infection of guava by *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum* under different temperatures and wetting periods. Trop. Plant. Pathol. 33(4): 265-272.
- Ventura, J. y R. Hinz. 2002. Controle das doenças da bananeira. p. 839-938. In: Zambolim L, Vale FXR, Monteiro AJA, Costa H (Eds.) Controle de doenças de plantas. Fruteiras. Vol. 2. Viçosa MG.

## Technical note / Nota Técnica

### In situ calibration of two FDR gauges under saline soil conditions in the hyperarid of Chile

Calibración *in situ* de dos sondas FDR bajo condiciones de suelo salino en el hiperárido de Chile

Calibração in situ de dois medidores FDR sob condições do solo salino, no hiper árido do Chile

Cristián Kremer Fariña\*, Rodrigo Candia Antich, Ian Homer Bannister y Oscar Seguel Seguel

Coll. Agronomic Scs, University of Chile, Santa Rosa 11315, La Pintana, Santiago, Chile.  
Postal code 8820808. E-mail: (CK) [ckremer@uchile.cl](mailto:ckremer@uchile.cl), ; (RC) [rcandia87@gmail.com](mailto:rcandia87@gmail.com),  (IH); [ihomer@uchile.cl](mailto:ihomer@uchile.cl), ; (OS) [oseguel@uchile.cl](mailto:oseguel@uchile.cl) .

#### Abstract

A calibration method was developed for two FDR sensors (GS3 and POGO) in saline soil conditions with predominantly fine textures and electrical conductivities that fluctuate between 4.4 and 16.5 dS.m<sup>-1</sup>. The methodology included the use of infiltration trenches and the recording of the variation of the water content over time. The results showed that there is an overestimation of  $\theta$  as a function of the salt content. The standard error obtained with the manufacturer's calibration was 0.09 and 0.19 cm<sup>3</sup>.cm<sup>-3</sup> for GS3 and POGO, respectively. After calibration, the standard error decreased to 0.04 and 0.05 cm<sup>3</sup>.cm<sup>-3</sup>, respectively. The R<sup>2</sup> of the calibration equations for GS3 and POGO were 0.94 and 0.86 respectively, not being necessary a differentiated calibration by salinity ranges. The GS3 sensor performed better than the POGO in the salinity conditions encountered.  
Keywords: soil water content, dielectric permittivity, soil salinity, dielectric constant.

#### Resumen

Se desarrolló un método de calibración para dos sensores FDR (GS3 y POGO) en condiciones de suelo salino con texturas predominantemente finas y

Received: 01-10-2020 • Accepted: 20-11-20.

\*Corresponding autor. Email:[ckremer@uchile.cl](mailto:ckremer@uchile.cl)

conductividades eléctrica que fluctúan entre 4,4 y 16,5 dS.m<sup>-1</sup>. La metodología contempló el uso de zanjas de infiltración y el registro de la variación del contenido del agua en el tiempo. Los resultados mostraron que existe una sobreestimación del en función del contenido de sal. El error estándar obtenido con la calibración del fabricante fue de 0,09 y 0,19 cm<sup>3</sup>.cm<sup>-3</sup> para GS3 y POGO, respectivamente. Después de la calibración, el error estándar disminuyó a 0,04 y 0,05 cm<sup>3</sup>.cm<sup>-3</sup>, respectivamente. El R<sup>2</sup> de las ecuaciones de calibración para GS3 y POGO fueron 0,94 y 0,86 respectivamente, no siendo necesaria una calibración diferenciada por rangos de salinidad. El sensor GS3 funcionó mejor que el POGO en las condiciones de salinidad encontradas.

**Palabras claves:** contenido de agua del suelo, permisividad dieléctrica, salinidad del suelo, constante dieléctrica.

## Resumo

Este trabalho focou em a calibração de dois sensores FDR (GS3 e POGO) em condições de solo salino em três olivais do Vale de Copiapó, no hiper árido do Chile (27,5°S), com texturas predominantemente finas e valores de condutividade eléctrica que flutuam entre 4.4 e 16.5 dS.m<sup>-1</sup>. A metodologia contemplou o uso de valas de infiltração e o registro da variação do conteúdo da água no tempo. Os resultados mostraram que existe uma sobre estimação do conteúdo de água nos solos salinos dependendo do teor de sal. O erro estándar obtido com a calibração do fabricante com respeito aos valores reais de  $\theta$  foi de 0.09 e 0.19 cm<sup>3</sup>.cm<sup>-3</sup> para GS3 y POGO, respectivamente. Depois da calibração, o erro estándar diminuiu a 0.04 e 0.05 cm<sup>3</sup>.cm<sup>-3</sup>, correspondentemente. O R<sup>2</sup> das equações de calibração para GS3 e POGO foram 0.94 e 0.86 respectivamente, sem necessidade de uma calibração diferenciada por faixas de salinidade. O sensor GS3 funcionou melhor que o POGO, nas condições de salinidade encontradas.

**Palavras chaves:** conteúdo de água do solo, permissividade dieléctrica, salinidade do solo, constante dieléctrica.

## Introduction

Indirect estimations of the soil's water content ( $\theta$ ), based on the variation of its dielectric permittivity ( $\epsilon_a$ ), particularly the dielectric constant ( $K_a$ ), have proven to be successful as a tool to establish a more efficient irrigation schedule (Callejas *et al.*, 2014).

## Introducción

Estimaciones indirectas del contenido de agua del suelo ( $\theta$ ), basadas en la variación de su permisividad dieléctrica ( $\epsilon_a$ ), particularmente la constante dieléctrica ( $K_a$ ), han demostrado su eficacia como una herramienta para establecer un programa de riego más eficiente (Callejas *et al.*, 2014).

Among the methods available to estimate  $\theta$ , Frequency Domain Reflectometry (FDR) provides measurements, by means of an electromagnetic wave that is transmitted along probes and records the frequency of the reflected wave, which depends on the capacitance of the medium where the probe is located, which is directly related to the  $\epsilon a$  of the soil (Sevostianova *et al.*, 2015). Later, the value of water content present in the soil is estimated using the model proposed by Topp *et al.* (1980):

$$\theta = 4,3 \times 10^{-6} \epsilon a^3 - 5,5 \times 10^{-4} \epsilon a^2 + 2,92 \times 10^{-2} \epsilon a - 5,3 \times 10^{-2} \quad (1)$$

This method works properly for most of the mineral soils. However, one of the greatest restrictions on the use of this technology is the content of salts, since soils rich in salts or with a high ionic charge (ex: Clay soils) can produce significant ionic and dielectric losses, over estimating the value of  $\epsilon a$  and  $\theta$  (Sevostianova *et al.*, 2015, Ojo *et al.*, 2015).

In recent years there has been an increase in soil water monitoring technologies that lead to improving the scheduling of micro-irrigation systems, but the low quality of irrigation water has led to soil salinization, which that affects the operation and calibration of these technologies. In this context, the main objectives of this research were: (1) to evaluate the accuracy in field of two FDR sensors used in salty soils, by comparing the soil moisture output from their factory default calibration with the volumetric water content determined using the thermogravimetric method, and (2) to develop a calibration equation for each sensor to operate correctly in these salty soils.

Entre los métodos disponibles para estimar  $\theta$ , se encuentra la Reflectometría de Dominio de Frecuencia (FDR), la cual proporciona medidas por medio de una onda electromagnética que se transmite a lo largo de las sondas y registra la frecuencia de la onda reflejada, la cual depende de la capacitancia del medio donde se encuentra la sonda, lo cual está directamente relacionado al  $\epsilon a$  del suelo (Sevostianova *et al.*, 2015). Posteriormente, se estima el valor del contenido del agua presente en el suelo utilizando el modelo propuesto por Topp *et al.* (1980):

$$\theta = 4,3 \times 10^{-6} \epsilon a^3 - 5,5 \times 10^{-4} \epsilon a^2 + 2,92 \times 10^{-2} \epsilon a - 5,3 \times 10^{-2} \quad (1)$$

Este método funciona correctamente para la mayoría de los suelos minerales. Sin embargo, una de las mayores restricciones sobre el uso de esta tecnología es el contenido de sales, ya que los suelos ricos en sales o con una alta carga iónica (ej: Suelos arcillosos) pueden producir pérdidas iónicas y dieléctricas significantes, sobreestimando el valor de  $\epsilon a$  y  $\theta$  (Sevostianova *et al.*, 2015, Ojo *et al.*, 2015).

En los años recientes ha habido un incremento en las tecnologías de monitoreo de agua en el suelo que llevan a el mejoramiento del horario de los sistemas de micro-riego, pero la baja calidad del agua de riego ha conllevado a la salinización del suelo, lo cual afecta la operación y la calibración de estas tecnologías. En este contexto, los objetivos principales de esta investigación fueron: (1) Evaluar la precisión

## Materials and methods

### Sites

The study was carried out in the Copiapó Province, Atacama Region, Chile, in three olive orchards, called “La Castellana” (27°19'00”S and 70°35'00”W), “Mallorquina” (27°20'00” S and 70°34'00”O) and “Vasangel” (27°18'00”S and 70°27'00”W). The climate of the area is low marginal desert type. The dominant soils are Aridisols, derived from deposits of the Copiapó River.

### Sites Characterization

A description was made through one pit for each site. Particle size distribution, bulk density by core method, and particle density by pycnometer were determined. The samples were obtained from the pits at 3 depths (30, 50 and 80 cm) with three replicates. Additionally, electrical conductivity was determined using the saturation extract method and conductivity determination. The samples were obtained from the previously mentioned pits at 3 depths (30, 50 and 80 cm) with one replicate.

### Gauges

The gauges used were: POGO (or Hydra Probe) (Stevens Water Monitoring Systems, USA), and GS3 (Decagon Devices, USA).

### Treatments and design of experiments

#### Calibration

Three trenches 0.6 m wide, 0.8 m long and 0.2 m deep were dug in each orchard. The purpose of these trenches was to remove the

en el campo de dos sensores FDR utilizados en suelos salinos, comparando la salida de humedad del suelo de su calibración por defecto, con el contenido volumétrico de agua determinado mediante el método termogravimétrico, y (2) desarrollar una ecuación de calibración para que cada sensor funcione correctamente en estos suelos salinos.

## Materiales y métodos

### Sitios de estudio

El estudio se llevó a cabo en la provincial de Copiapó, región de Atacama, Chile, en tres huertos de olivo, llamados “La Castellana” (27°19'00”S y 70°35'00”W), “Mallorquina” (27°20'00” S y 70°34'00”O) y “Vasangel” (27°18'00”S y 70°27'00”W). El clima del área es de tipo desierto marginal bajo. Los suelos dominantes son los aridisoles, derivados de los depósitos del río Copiapó.

### Caracterización de sitios de estudio

Se realizó una descripción a través de una fosa para cada sitio. Se determinó la distribución del tamaño de las partículas, la densidad aparente por el método del núcleo y la densidad de las partículas por el picnómetro. Las muestras se obtuvieron de las fosas a tres profundidades (30, 50 y 80 cm) con tres replicas. Adicionalmente, la conductividad eléctrica se determinó utilizando el método del extracto de saturación y la determinación de la conductividad. Las muestras se obtuvieron de las fosas mencionadas

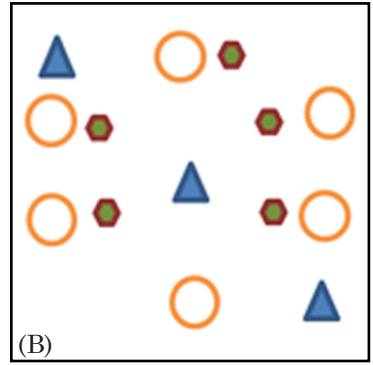
horizon of salt accumulation due to capillary ascents, and to generate a homogeneous infiltration zone (Figure 1a). Once ready they were filled once with irrigation water and the water was expected to fully infiltrate. Once this condition was fulfilled, it was waited 1 hour to carry out the first measurement (Ti1).

anteriormente a 3 profundidades (30, 50 y 80 cm) con una réplica.

### Sensores

Los sensores utilizados fueron: POGO (o Hydra Probe) (Stevens Water Monitoring Systems, USA), y GS3 (Decagon Devices, USA).

### Tratamientos y diseño experimental



**Figure 1. Calibration trenches for GS3 and POGO sensors.** (a) Trenches; (b) gauge positions (triangles GS3, rhombuses POGO) and soil samples (circles thermogravimetric method).

**Figura 1. Zanjas de calibración para los sensores GS3 y POGO.** (a) Zanjas; (b) posiciones de sensores (triángulos: GS3, rombos: POGO) y muestras de suelo (método termogravimétrico: círculos).

Previously, at the bottom of each trench, three GS3 sensors were installed in a horizontal and permanent position (Figure 1b, 9 sensors per site). In the case of the POGO sensor, in each measurement periods, 5 points were recorded for each trench, introducing it perpendicular to the bottom of the trench. The soil was then allowed to dry for 12 hours and the

### Calibración

Se excavaron tres zanjas de 0,6 m de ancho, 0,8 m de largo y 0,2 m de profundidad en cada huerto. La finalidad de estas zanjas era eliminar el horizonte de acumulación de sales debido a los ascensos capilares y generar una zona de infiltración homogénea (Figura 1a). Una vez listas se llenaron con agua de riego y se esperaba que el



corresponding measurements for Ti2 were repeated, 4 more measurement periods were made following the same procedure already described, however the remaining measurement times varied according to the site, we sought to obtain data in a wide range of  $\theta$ . For each measurement period (Ti) and site, data was taken every 2 minutes, for 20 minutes and registered in a Datalogger (Em50, Decagon Devices) for GS3 and by hand for POGO.

Immediately after recording all the data from the gauges in each measurement period, a soil core sample was taken to determine its volumetric water content ( $\theta$ ) by thermogravimetry (Figure 1b).

Prior to field installation, the difference in the records between sensors of the same origin was reviewed. For both the GS3 and POGO gauges, an analysis of variance was performed with measurements in free water, where no significant differences were found for the measured parameters ( $\theta$ ,  $\epsilon_a$ ) at a significance level of 5% ( $p \leq 0.05$ ).

### Statistical analysis

A grade 3 polynomial regression was utilized to fit the Topp *et al.* (1980) equation parameters, using the permittivity outputs from the sensors as the independent variable and the thermogravimetric soil water contents as the dependent variable. The coefficient of determination ( $R^2$ ), was used to display the degree of similarity between the sensor calibration equation and soil thermogravimetric measurements. Additionally, linear regressions were adjusted where the dependent variable was the soil

agua se infiltrara completamente. Una vez cumplida esta condición, se esperó 1 hora para realizar la primera medición (Ti1).

Previamente, en el fondo de cada zanja, se instalaron tres sensores GS3 en posición horizontal y permanente (Figura 1b, 9 sensores por sitio). En el caso del sensor POGO, en cada período de medición se registraron 5 puntos por cada zanja, introduciéndolo perpendicularmente al fondo de la misma. Luego se dejó secar el suelo durante 12 horas y se repitieron las mediciones correspondientes para Ti2, se realizaron 4 períodos de medición más siguiendo el mismo procedimiento ya descrito, sin embargo, los tiempos de medición restantes variaron según el sitio, se buscó obtener datos en un amplio rango de  $\theta$ . Para cada periodo de medición (Ti) y sitio, se tomaron datos cada 2 minutos, durante 20 minutos y se registraron en un Datalogger (Em50, Decagon Devices) para GS3 y a mano para POGO.

Inmediatamente después de registrar los datos de los sensores en cada período de medición, se tomó una muestra de núcleo de suelo para determinar su contenido volumétrico de agua ( $\theta$ ) por termogravimetría (Figura 1b).

Antes de la instalación de campo, se revisó la diferencia de los registros entre los sensores del mismo origen. Tanto para los sensores GS3 como para los POGO, se realizó un análisis de varianza con mediciones en agua libre, donde no se encontraron diferencias significativas para los parámetros medidos ( $\theta$ ,  $\epsilon_a$ ), a un nivel de significancia de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

water content obtained from the factory calibrations and from this work, and the independent variable was the soil water content obtained by thermogravimetry. Slopes were compared using Student's t test, with a 95 % confidence level. Furthermore, the standard error of estimates (SEE, equation 2) was utilized to compare the performance of the different equations to estimate the real soil water content (Thermogravimetry):

$$SEE = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{N}} \quad (2)$$

Where N is number of pair data (x), is the predicted soil water content and is the soil water content from thermogravimetry. As the smaller SEE is, the better it's the model performance.

## Results and discussion

### Texture, particle density and bulk density

The results showed silt contents in a wide range (29.8 % to 78 %), with a dominance of this fraction, which generates textural class soils ranging from loam to silty loam. The values obtained for the bulk density ranged between 1.07 and 1.39 Mg.m<sup>-3</sup> were lower than would be expected based on the texture class presented by the sampled horizons, especially at the Mallorquina site. The values of particle density were relatively homogeneous and high (2.73 to 2.83 Mg.m<sup>-3</sup>) compared to the reference value of 2.65 Mg.m<sup>-3</sup> indicated by Sandoval *et al.* (2012).

### Análisis estadístico

Se utilizó una regresión polinómica de 3<sup>er</sup> grado para ajustar los parámetros de la ecuación de Topp *et al.* (1980), utilizando las salidas de permisividad de los sensores como una variable independiente y los contenidos termograviméticos de agua del suelo como variable dependiente. El coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>), se utilizó para mostrar el grado de similitud entre la ecuación de calibración del sensor y las mediciones termogravimétricas del suelo. Adicionalmente, las regresiones lineales se ajustaron donde la variable dependiente fue el contenido de agua del suelo obtenido de las calibraciones de fábrica y de este trabajo, y la variable independiente fue el contenido de agua del suelo obtenido por termogravimetría. Las pendientes se compararon mediante la prueba T de Student, con un nivel de confianza (seguridad) del 95 %. Además, se utilizó el error estándar de las estimaciones (SEE, ecuación 2) para comparar el rendimiento de las diferentes ecuaciones y estimar el contenido real de agua del suelo termogravimetría:

$$SEE = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{N}} \quad (2)$$

Donde N es el número de datos pares (x), es el contenido de agua del suelo esperado, e es el contenido de agua del suelo por termogravimetría. Cuanto más pequeño sea el SEE, mejor será el rendimiento del modelo.

## Electrical conductivity in saturated extract (ECs)

The ECs values characterize these soils as saline. For all sites, the most extended values of ECs were found in the most superficial horizons, decreasing in depth. The highest ECs ranges were found in Mallorca (15.2 to 16.5 dS.m<sup>-1</sup>), followed by Vasangel (6.58 to 9, 71 dS.m<sup>-1</sup>) and La Castellana (5.83 to 7.59 dS.m<sup>-1</sup>).

## Soil water content and gauges measurements

All the measurements obtained from the sites are detailed on Table 1. It is important to notice that there is an anomaly on the results of soil water content in La Castellana site, specifically there is a value of 0.63 cm<sup>3</sup>. cm<sup>-3</sup>, which is larger than the porosity of the soil. For further analysis, it will not be considered.

Figure 2 shows  $\theta$  measured by the sensors as a function of the  $\theta$  obtained by thermogravimetry, in a 1:1 relationship. The soil water content measured by the sensors (based on factory calibration) showed a clear overestimation over the entire measurement range (Table, 1, Figure 2). Both sensors behave pretty consistent and similar on the range between 0.2 to 0.4 cm<sup>3</sup>.cm<sup>-3</sup>, however, with larger soil water contents POGO had a larger overestimation.

Equations 3 and 4 were developed considering all the sampling periods in the different sites with the average permittivity values obtained by each sensor (Figure 3)

In this way, considering the data set of the three soils under study, the following calibration equations were obtained:

## Resultados y discusión

### Textura, densidad de las partículas y densidad aparente

Los resultados mostraron contenidos de limo en un amplio rango (29,8 % a 78 %), con una dominancia de esta fracción, lo cual genera una clase textural de suelos que van desde franco a franco limoso. Los valores obtenidos para la densidad aparente variaron entre 1,07 y 1,39 Mg.m<sup>-3</sup>, fueron inferiores a lo esperado, en función a la clase textural presentada por los horizontes muestreados, especialmente en el sitio Mallorca. Los valores de densidad de las partículas fueron relativamente homogéneos y elevados (2,73 a 2,83 Mg.m<sup>3</sup>), comparados a el valor de referencia de 2,65 Mg.m<sup>-3</sup> indicado por Sandoval *et al.* (2012).

### Conductividad eléctrica en extracto saturado (CEs)

Los valores de CEs caracterizan estos suelos como salinos. Para todos los sitios, los valores más extensos de CEs se encontraron en los horizontes más superficiales, disminuyendo en profundidad. Los rangos más altos de CEs se encontraron en Mallorca (15,2 a 16,5 dS.m<sup>-1</sup>), seguidos por Vasangel (6,58 a 9,71 dS.m<sup>-1</sup>) y La Castellana (5,83 a 7,59 dS.m<sup>-1</sup>).

### Contenido de agua del suelo y medidas de los sensores

Todas las mediciones obtenidas de los sitios se detallan en el cuadro 1. Es importante mencionar que existe una anomalía en los resultados del contenido de agua del suelo en el sitio La Castellana, específicamente existe un valor de 0,63 cm<sup>3</sup>.cm<sup>-3</sup>, lo cual es

**Table 1. Measurements of volumetric water content ( $\text{cm}^3.\text{cm}^{-3}$ ) obtained from the field. Values of GS3 and Hydra Probe sensors, and direct measurement (Soil).**

**Cuadro 1. Mediciones del contenido volumétrico de agua ( $\text{cm}^3.\text{cm}^{-3}$ ) obtenidas en el campo. Valores de los sensores GS3 e Hydra Probe, y de la medición directa (suelo).**

Site	Ti	GS3			POGO						Soil			
		$\theta$ ( $\text{cm}^3.\text{cm}^{-3}$ )			$e_a$			$\theta$ ( $\text{cm}^3.\text{cm}^{-3}$ )			$e_a$			$\theta$ ( $\text{cm}^3.\text{cm}^{-3}$ )
		Prom	Desv	CV	Prom	Desv	CV	Prom	Desv	CV	Prom	Desv	CV	
Mallorquina	1	0.485	0.032	6.67	28.53	4.43	15.54	0.47	0	0.98	36.29	0.47	1.3	0.35
	2	0.477	0.046	9.64	28.1	6.03	21.46	0.38	0.06	15.01	26.15	5.06	19.34	0.38
	3	0.448	0.043	9.66	24.61	4.8	19.51	0.49	0.05	11.11	38.86	6.35	16.33	0.3
	4	0.359	0.039	10.81	17.27	2.55	14.79	0.33	0.04	10.89	23.05	3.37	14.63	0.27
	5	0.31	0.041	13.3	14.39	2.24	15.61	0.3	0.02	5.97	19.68	1.46	7.39	0.23
	6	0.276	0.021	7.53	12.55	1.01	8.08	0.23	0.02	9.38	14.39	1.51	10.51	0.22
La Castellana	1	0.588	0.026	4.37	48.89	5.25	10.75	0.68	0.15	21.59	65.59	21.04	32.07	0.58
	2	0.579	0.019	3.25	47.14	4.56	9.67	0.44	0.11	25.49	33.21	11.82	35.59	0.63
	3	0.571	0.026	4.6	44.91	5.93	13.21	0.93	0.05	5.22	105.19	9.12	8.67	0.58
	4	0.568	0.026	4.62	44.46	5.87	13.21	0.84	0.05	5.47	87.78	7.66	8.72	0.56
	5	0.554	0.059	10.66	42.75	9.2	21.52	0.83	0.11	12.76	86.88	17.09	19.67	0.53
	6	0.556	0.086	15.49	43.85	12.8	29.19	0.8	0.11	13.48	84.72	17.09	20.17	0.44
Vasangel	1	0.406	0.04	9.95	20.69	3.11	15.03	0.44	0.03	6.58	32.34	3.03	9.37	0.27
	2	0.364	0.048	13.17	17.64	3.05	17.31	0.39	0.03	7.64	27.41	2.83	10.34	0.24
	3	0.354	0.052	14.72	17.09	3.23	18.91	0.42	0.01	2.87	31.37	1.31	4.17	0.28
	4	0.319	0.04	12.64	14.87	2.23	15.02	0.37	0.03	7.49	25.73	2.6	10.11	0.3
	5	0.284	0.03	10.55	13.13	1.75	13.34	0.3	0.01	2.53	19.68	0.64	3.26	0.21
	6	0.25	0.018	7.4	11.29	0.85	7.49	0.24	0.02	10.26	15.12	1.71	11.34	0.14

Ti: time interval; Av: average (n=9 GS3, n=15 POGO); S: standard deviation; CV: coefficient of variation.

Ti: Intervalo de tiempo; Av: promedio (n=9 GS3, n=15 POGO); S: desviación estándar; CV: Coeficiente de variación

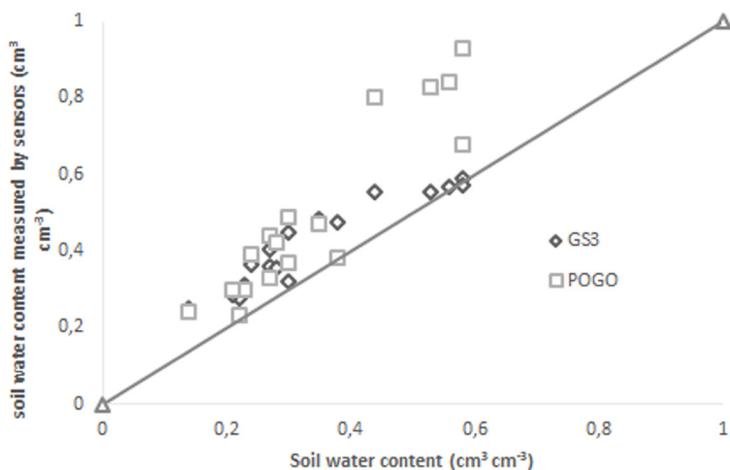


Figure 2. Average soil water content (n=9 GS3, n=15 POGO) measured by the sensors as a function of the soil water content obtained by thermogravimetry.

Figura 2. Contenido promedio de agua del suelo (n=9 GS3, n=15 POGO) medido por los sensores en función del contenido de agua del suelo obtenido por termogravimetría.

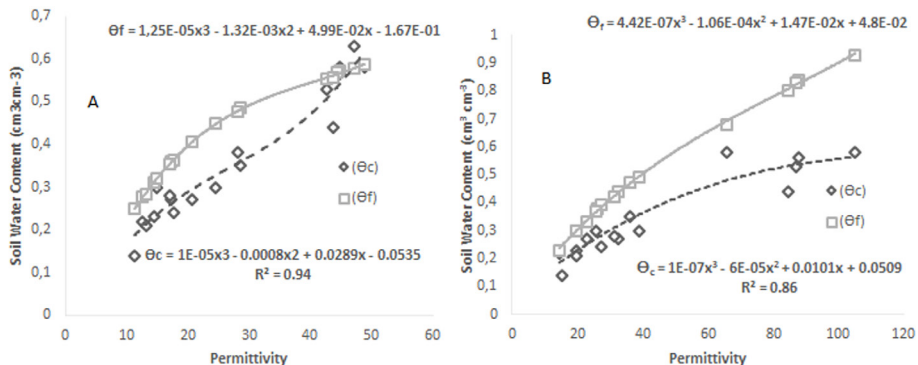


Figure 3. Soil water content curves obtained from factory calibration ( $\theta_f$ ) and the calibration from this work ( $\theta_c$ ) for the GS3 (A) and POGO (B) sensors.

Figura 3. Curvas del contenido de agua del suelo obtenidas a partir de la calibración de fábrica ( $\theta_f$ ) y de la calibración de este trabajo ( $\theta_c$ ) para los sensores GS3 (A) y POGO (B).

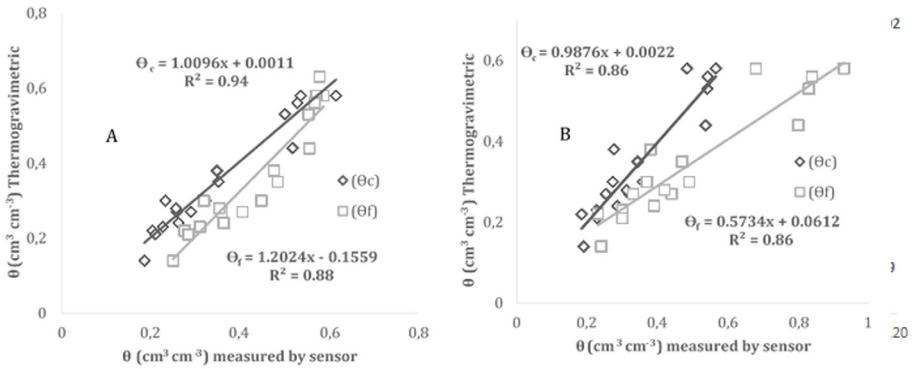


Figure 4. Relationship between the soil water contents estimated by the thermogravimetric method with the Factory calibration ( $\theta_p$ ) and the calibration equation generated with this work ( $\theta_c$ ) for the GS3 (A) and POGO (B) sensors.

Figure 4. Relación entre los contenidos de agua del suelo estimados por el método de termogravimetría con la calibración de fábrica ( $\theta_p$ ) y la ecuación de calibración generada con este trabajo ( $\theta_c$ ) para los sensores GS3 (A) y POGO (B).

$$\theta_{GS3} = 10^{-5}\epsilon_a^3 - 0.0008\epsilon_a^2 + 0.0289\epsilon_a - 0.0535 \quad (3)$$

$$\theta_{POGO} = 10^{-7}\epsilon_a^3 - 6 \times 10^{-5}\epsilon_a^2 + 0.0101 \times 10^{-3}\epsilon_a + 0.00509 \quad (4)$$

Considering the breadth of silt content and salinity levels, the sensors work well, adjusting with good performance (Figure 3) over a wide range of soil conditions. The SEE obtained with the manufacturer’s calibration with respect to the real values of  $\theta$  is 0.09 and 0.19  $\text{cm}^3.\text{cm}^{-3}$  for the GS3 and POGO, respectively. The behavior of the error is different in each case: for GS3 gauge, the error increase with lower water contents, while in POGO gauge the error increase with higher water content. On the other hand, the calibration equations (3 and 4) showed high determination

mayor que la porosidad del suelo. Para el análisis posterior, no se tendrá en cuenta.

Las ecuaciones 3 y 4 se desarrollaron considerando todos los períodos de muestreo en los diferentes sitios con los valores promedio de permisividad obtenidos por cada sensor (Figura 3).

En este sentido, considerando el conjunto de datos de los tres suelos en estudio, se obtuvieron las siguientes ecuaciones de calibración:

$$\theta_{GS3} = 10^{-5}\epsilon_a^3 - 0.0008\epsilon_a^2 + 0.0289\epsilon_a - 0.0535 \quad (3)$$

$$\theta_{POGO} = 10^{-7}\epsilon_a^3 - 6 \times 10^{-5}\epsilon_a^2 + 0.0101 \times 10^{-3}\epsilon_a + 0.00509 \quad (4)$$

Considerando la amplitud del contenido de limo y los niveles de salinidad, los sensores funcionan bien, ajustándose con un buen

coefficients, varying from 0.94 to 0.86 for the GS3 and POGO respectively (Figure 3), reducing the SEE to 0.04 and 0.05  $\text{cm}^3.\text{cm}^{-3}$ , for the GS3 and POGO respectively. These results are similar to those obtained by Fares *et al.* (2009) who worked with an ECH2O model EC-20 sensor (Decagon Devices, Inc., Pullman WA, USA) managing to reduce the salinity error to 2 % with calibration for saline conditions.

In addition, the linear relationship between the  $\theta$  values estimated by the sensor and those estimated by the fitted model against the values obtained through thermogravimetry (Figure 4) showed different slope behavior. While the GS3, the regression slopes did not show statistical differences, the Pogo's slopes did. These results depicted a more confident performance of the GS3 gauge under saline condition. The linear adjustments of GS3 measurements in function of direct measurement, showed high significance with both, the calibration ( $\theta_c$ ,  $R^2 = 0.94$ ) and the factory ( $\theta_f$ ,  $R^2 = 0.84$ ) equations, with standard errors of 0.04 ( $\theta_c$ , similar to that found with the adjusted polynomial equation) and 0.05  $\text{cm}^3.\text{cm}^{-3}$  ( $\theta_f$ ). This is interesting because of, although the linear adjustment with the calibrated values has a slope close to unity, the adjustment made with the direct values measured with the gauge, usually simpler to execute, may be an alternative to consider. In the case of the POGO, we got a similar conclusion, were  $R^2$  and SEE were close to 0.86 and 0.05  $\text{cm}^3.\text{cm}^{-3}$  respectively for the two adjustments.

rendimiento (Figura 3) a una amplia gama de condiciones del suelo. El SEE obtenido con la calibración de fábrica con respecto a los valores reales de  $\theta$  es de 0,09 y 0,19  $\text{cm}^3.\text{cm}^{-3}$  para el GS3 y POGO, respectivamente. El comportamiento de error es diferente en cada caso: Para el sensor GS3, el error aumenta con contenidos de agua más bajos, mientras que en el sensor POGO, el error aumenta con contenidos de agua más altos. Por otro lado, las ecuaciones de calibración (3 y 4) mostraron altos coeficientes de determinación, variando de 0,94 a 0,86 para GS3 y POGO respectivamente (Figura 3), reduciendo el SEE de 0,04 y 0,05  $\text{cm}^3.\text{cm}^{-3}$ , para GS3 y POGO respectivamente. Estos resultados son similares a aquellos obtenidos por Fares *et al.* (2009) quienes trabajaron con un sensor ECH2O modelo EC-20 (Decagon Devices, Inc., Pullman WA, USA) consiguiendo reducir el error de salinidad al 2 % con la calibración para condiciones salinas.

Además, la relación lineal entre los valores de  $\theta$  estimados por el sensor y aquellos estimados por el modelo ajustado frente a los valores obtenidos a través de la termogavimetría (figura 4) mostró un comportamiento diferente de pendiente. Mientras que, en el GS3, las pendientes de regresión no mostraron diferencias estadísticas, las pendientes de POGO sí. Estos resultados mostraron un rendimiento más seguro del medidor GS3 en condiciones salinas. Los ajustes lineales de las mediciones del GS3 en función de las mediciones directas, mostraron una alta significancia tanto para la ecuación de calibración ( $\theta_c$ ,  $R^2$

Although both sensors overestimated the  $\theta$ , they performed reasonably well under variable conditions using factory calibration, and only POGO experienced difficulties at one of the sites. However, the estimates can be improved with local calibrations, which is of utmost importance in soils with high salt content.

## Conclusion

The results showed that there is an overestimation of  $\theta$  as a function of the salt content. When comparing the sensors of this study with the factory calibration, the GS3 sensor better represent the value of  $\theta$  in the three study sites, with a lower SEE of  $0.09 \text{ cm}^3 \text{ cm}^{-3}$ , while the POGO sensor presented a greater error in its estimation, having a SEE of  $0.19 \text{ cm}^3 \text{ cm}^{-3}$ . Once calibrated, the sensors achieve estimations with a low SEE ranging from  $0.04$  to  $0.05 \text{ cm}^3 \text{ cm}^{-3}$ , respectively. The calibration equations obtained are valid for the entire range of ECs and  $\theta$  in which this study was performed. However, it must be considered for their use that they are specific for the soils of this study or others with similar characteristics and physical properties.

### End of English Version

= 0,94) como para la de fábrica ( $\theta_f$ ,  $R^2 = 0,84$ ) con errores estándar de  $0,04$  ( $\theta_c$ , similar al encontrado con la ecuación polinómica ajustada) y  $0,05 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$  ( $\theta$ ).

Esto resulta interesante, porque, aunque el ajuste lineal con los valores calibrados tiene una pendiente cercana a la unidad, el ajuste realizado con los valores directos medidos con el sensor, normalmente más sencillo de ejecutar, puede ser una alternativa a considerar. En el caso del POGO, obtuvimos una conclusión similar, ya que  $R^2$  y el SEE fueron cercanos a  $0,86$  y  $0,05 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3}$  respectivamente para los dos ajustes.

Aunque ambos sensores sobreestimaron el  $\theta$ , funcionaron razonablemente bien bajo las condiciones de variable utilizando la calibración de fábrica, y solo POGO experimentó dificultades en uno de los sitios. Sin embargo, las estimaciones pueden mejorarse con calibraciones locales, lo cual es de suma importancia en suelos con alto contenido de sal.

## Conclusion

Los resultados mostraron que existe una sobreestimación de  $\theta$  en función del contenido de sal. Al comparar los sensores de este estudio con la calibración de fábrica, el sensor GS3 representa mejor el valor de  $\theta$  en los tres sitios de estudio, con un SEE menor de  $0,09 \text{ cm}^3 \text{ cm}^{-3}$ , mientras que el sensor POGO presentó un mayor error en su estimación, teniendo un SEE de  $0,19 \text{ cm}^3 \text{ cm}^{-3}$ . Una vez calibrados, los sensores consiguen estimaciones con un bajo SEE que oscila entre  $0,04$  a  $0,05 \text{ cm}^3 \text{ cm}^{-3}$ , respectivamente. Las ecuaciones de calibración obtenidas son válidas para todo el rango de CE y  $\theta$  en el cual se llevó a cabo este estudio. Sin embargo, debe considerarse para



su uso que éstas son específicas para los suelos de este estudio u otros con características y propiedades físicas similares.

### Cited literature

Callejas, R., C. Kremer y M. Rioseco. 2014. Experiencia práctica en la implementación de monitorización continúa. p.86-101. In: Callejas, R., Vera, J., Kremer, C (Eds.). Riego de precisión en frutales con sensores de suelo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas.

Fares, A., M. Safeeq and D.M. Jenkins.2009. Adjusting Temperature and Salinity Effects on Single Capacitance Sensors. *Pedosphere*. 19(5):588-596.

Ojo, E.R., P. Bullock, and J. Fitzmaurice. 2015. Field performance of five soil moisture

Sandoval, E., J. Dörner, O. Seguel, J. Cuevas y D. Rivera. 2012. Métodos de análisis físicos de suelos. Universidad de Concepción. Publicaciones Departamento de Suelos y Recursos Naturales, Chillan, Chile. 80p.

Sevostianova, E., S. Deb, M. Serena, D. Vanleeuwen and B. Leinauer. 2015. Accuracy of two electromagnetic soil water content sensors in saline soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 79: 1752-1759.



Topp, G., J. Davis and A. Annan. 1980. Electromagnetic determination of soil water content: Measurements in coaxial transmission lines. *Water Resour. Res.* 16(3): 574-582.

## Discriminación de malezas basada en la respuesta espectral del cultivo de maíz, Manabí, Ecuador

Weed discrimination based on the spectral response of the corn crop, Manabí, Ecuador

Discriminação de plantas daninhas com base na resposta espectral da cultura do milho, Manabí, Equador

Cinthy K. Pinargote Intriago<sup>1\*</sup> y Henry A. Pacheco Gil<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Maestría en Ingeniería Agrícola, Instituto de Postgrado, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador. Correo electrónico: cinthyapinargote@gmail.com, . <sup>2</sup>Facultad de Ingeniería Agrícola, Universidad Técnica de Manabí, Ecuador. Correo electrónico: henrypacheco@gmail.com, .

### Resumen

La agricultura de precisión permite ganar eficacia, sustentabilidad y rentabilidad, ya que aporta grandes beneficios en disminuir el impacto ambiental de la agricultura, los riesgos económicos y al mismo tiempo contribuye a controlar el vigor de los cultivos y mejorar la calidad del rendimiento de los mismos. El objetivo de esta investigación es discriminar malezas dentro del cultivo de maíz, basados en su respuesta espectral. Para ello se usó el avanzado Dron agrícola *EBEE SQ*, con el cual se capturó imágenes multiespectrales a través de su cámara *Parrot Sequoia*. Las imágenes fueron procesadas con software en Sistemas de Información Geográfica (SIG). Con las bandas multiespectrales se calcularon diferentes índices de vegetación tales como NDVI, NDVIAS, NGRDI, NDRE, GNDVI, usando herramientas de álgebra de mapas en programas especializados. A los diferentes índices se les aplicó una clasificación supervisada para discriminar las distintas coberturas de suelo, la cual obtuvo una precisión del 93% y un índice de Kappa de 0,93. Los resultados permitieron diferenciar claramente la cobertura de cultivos, malezas y suelo desnudo. Los datos mostraron que la maleza tanto de crecimiento temprano como las desarrolladas ocupan un 38% del área del cultivo. Con esta información se puede mejorar la planificación de prácticas agronómicas, agregando el herbicida en el sitio específico de las malezas.

**Palabras clave:** Vehículo aéreo no tripulado, detección remota, índices de vegetación, clasificación supervisada.

Recibido: 20-10-2020 • Aceptado: 11-01-2021.

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

## Abstract

Precision agriculture allows to gain efficiency, sustainability and profitability, since it provides great benefits in reducing the environmental impact of agriculture, economic risks and at the same time contributes to controlling the vigor of crops and improving the quality of their yield. The objective of this research is to discriminate weeds within the corn crop, based on their spectral response. For this, the advanced *EBEE SQ* agricultural drone was used, with which multispectral images were captured through its *Parrot Sequoia* camera. The images were processed with software in Geographic Information Systems (GIS). With the multispectral bands, different vegetation indices were calculated such as NDVI, NDVIAS, NGRDI, NDRE, GNDVI, using map algebra tools in specialized programs. A supervised classification was applied to the different indices to discriminate the different land covers, which obtained a precision of 93% and a Kappa index of 0.93. The results allowed to clearly differentiate the coverage of crops, weeds and bare soil. The data showed that both early-growing and developed weeds occupy 38% of the crop area. With this information, it is possible to improve the planning of agronomic practices, adding the herbicide at the specific site of the weeds.

**Keywords:** Unmanned aerial vehicle, remote sensing, vegetation index, supervised classification.

## Resumo

A agricultura de precisão permite ganhos de eficiência, sustentabilidade e rentabilidade, pois proporciona grandes benefícios na redução do impacto ambiental da agricultura, dos riscos econômicos e ao mesmo tempo contribui para controlar o vigor das lavouras e melhorar a qualidade de sua produção. O objetivo desta pesquisa é discriminar plantas daninhas na cultura do milho, com base em sua resposta espectral. Para isso, foi utilizado o drone agrícola *EBEE SQ* avançado, com o qual imagens multiespectrais foram capturadas por meio de sua câmera *Parrot Sequoia*. As imagens foram processadas com software em Sistemas de Informações Geográficas (SIG). Com as bandas multiespectrais, diferentes índices de vegetação foram calculados como NDVI, NDVIAS, NGRDI, NDRE, GNDVI, utilizando ferramentas de álgebra de mapas em programas especializados. Foi aplicada uma classificação supervisionada aos diferentes índices para discriminar as diferentes coberturas do solo, que obteve uma precisão de 93% e um índice Kappa de 0,93. Os resultados permitiram diferenciar claramente a cobertura de lavouras, ervas daninhas e solo descoberto. Os dados mostraram que tanto as ervas daninhas de crescimento precoce quanto as desenvolvidas ocupam 38% da área de cultivo. Com essas informações, é possível aprimorar o planejamento das práticas agrônomicas, adicionando o herbicida no local específico das plantas daninhas.

**Palavras-chave:** Veículo aéreo não tripulado, sensoriamento remoto, índices de vegetação, classificação supervisionada.

## Introducción

En la agricultura, las malezas son parte constituyente de los componentes del agroecosistema por ser plantas inevitables e indeseables que se desarrollan de manera espontánea dentro o fuera de los cultivos, las mismas que mantienen un comportamiento muy dinámico en la composición florística, ya que generan cambios significativos en el suelo y en las plantas.

Actualmente en el Ecuador las malezas representan uno de los rubros más significativos dentro del sector agropecuario, ya que dada su fisiología son resistentes a los productos químicos e incluso toleran altas temperaturas ambientales, lo cual les resulta ventajoso para su supervivencia. De este modo van ganando espacio en los suelos para competir con las plantas cultivadas. Por ello, a los agricultores les está generando un importante consumo monetario siendo este aproximadamente de \$1045 por hectárea en la compra de insumos, mano de obra y riego para el cultivo de maíz (Páliz *et al.*, 2019; Martínez y Barrera, 2020).

Las malezas afectan de manera directa a la siembra, debido a que liberan sustancias que reducen el desarrollo del cultivo y aprovechan los recursos como agua, luz, nutrientes y espacio, que podrían estar disponibles para el cultivo durante su ciclo de crecimiento. Así mismo, perjudica de forma indirecta la preparación de la cama del cultivo y contamina el producto a cosechar dado que disminuye su calidad comercial.

## Introduction

In agriculture, weeds are a constituent part of agroecosystem because they are unavoidable and undesirable plants that develop spontaneously inside or outside the crops, which maintain a very dynamic behavior in the floristic composition, since they generate significant changes on soil and plants.

Currently in Ecuador, weeds are one of the most significant items within the agricultural sector, since given their physiology they are resistant to chemical products and even tolerate high environmental temperatures, which is advantageous for their survival. In this way they are gaining space in the soils to compete with cultivated plants. Therefore, it is generating significant money consumption for farmers, this being approximately US\$ 1045 per hectare in the purchase of inputs, labor and irrigation for cultivation of corn (Páliz *et al.*, 2019; Martínez and Barrera, 2020).

Weeds directly affect planting, because they release substances that reduce the development of the crop and take advantage of resources such as water, light, nutrients and space, which could be available for the crop during its growth cycle. Likewise, it indirectly impairs the preparation of the crop bed and contaminates the product to be harvested since it decreases its commercial quality. In addition, it hinders harvesting work, increases the risk of pests and diseases, acting as their hosts and generating economic losses due to

Además, obstaculiza las labores de cosecha, aumenta el riesgo de plagas y enfermedades, actuando como hospedantes de las mismas y generando pérdidas económicas por bajos rendimientos, menor calidad del cultivo y aumento en los costos de cosecha (Pérez *et al.*, 2014).

Para contrarrestar este tipo de inconvenientes los agricultores realizan un control de malezas de manera manual y tradicional con los herbicidas, esto solo genera altos costos en compra de estos productos químicos y además de las operaciones, lo que conlleva una inversión de tiempo y trabajadores para la aplicación del mismo (Santana, *et al.*, 2020). De manera que, el productor aplica el químico en zonas donde no hay maleza para evitar que esta llegue a crecer, pero esto en definitiva lo que causa es el desperdicio en gran medida del producto y a su vez afecta al suelo perjudicando sus propiedades físicas, químicas y biológicas, además que contamina el aire por el exceso del químico y perjudica la salud del cultivador.

Para tener un control y evitar la contaminación ambiental por el desperdicio del producto fitosanitario se debe aplicar métodos de teledetección para el manejo de la maleza. Es por eso que, en esta investigación se introduce una de las tecnologías más innovadoras como es el uso de vehículos aéreos no tripulados (UAV). Estos ofrecen la posibilidad de recopilación de datos para las resoluciones espaciales, temporales deseadas y en conjunto con sus cámaras obtienen imágenes

low yields, lower crop quality and increased harvest costs (Pérez *et al.*, 2014).

To counteract this kind of inconvenience, farmers carry out manual and traditional weed control with herbicides, this only generates high costs in the purchase of these chemical products and in addition to operations, which entails an investment of time and workers for its application (Santana, *et al.*, 2020). So, the producer applies the chemical in areas where there is no weed to prevent it from growing, but this ultimately causes the waste to a large extent of the product and in turn affects the soil, damaging its physical and chemical properties. and biological, besides that it pollutes the air due to excess of chemical and harms farmer's health.

To control and avoid environmental contamination by waste of the phytosanitary product, remote sensing methods must be applied for weed management. This research introduces one of the most innovative technologies, such as the use of unmanned aerial vehicles (UAV). These have the advantage of collecting data for the desired spatial and temporal resolutions and together with their cameras they obtain spectral images (Adão *et al.*, 2017; Cevallos *et al.*, 2019).

The images in the infrared and visible spectra are especially useful in agriculture, since chlorophyll concentrations in the leaves or rates of photosynthetic activity can be seen, detecting processes in crops such as stress in vegetation, due to the presence pests and diseases, lack of

espectrales (Adão *et al.*, 2017; Cevallos *et al.*, 2019).

Las imágenes en el espectro infrarrojo junto con las del espectro visible, son especialmente útiles en agricultura, ya que se puede visualizar las concentraciones de clorofila en las hojas o tasas de actividad fotosintética, detectando procesos en los cultivos tales como el stress en la vegetación, producido por la presencia de plagas y enfermedades, falta de agua, problemas de suelos o baja de nutrientes (stress nutricional) (Saavedra *et al.*, 2018).

Diferentes investigaciones han establecidos que las imágenes antes mencionadas también ayudan al análisis discriminante de malezas, mediante los mapas de índices de vegetación que contribuyen a obtener el momento fenológico propicio para su discriminación y así mediante estudios tener la diferencia espectral existente entre el cultivo y los parches de maleza, a fin de realizar las aplicaciones de los agroquímicos en el sitio específico sin desperdicio alguno (Peña *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2019; Yang, 2020; Radoglou, *et al.*, 2020).

Por tal razón este trabajo de investigación se desarrolló con el fin de discriminar las malezas basada en la respuesta espectral del cultivo de maíz, para conocer la ubicación exacta de las malas hierbas y así proponer alternativas de manejo y uso sostenible de los productos químicos como los herbicidas. Es por ello que, con aplicación directa de los herbicidas en los parches de maleza, se reducirá tiempo, costos operacionales y existirá una cantidad menor de agroquímicos

water, soil problems or low nutrients (nutritional stress) (Saavedra *et al.*, 2018).

Different investigations have established that these images also help the discriminant analysis of weeds, through vegetation index maps that help to obtain the phenological moment conducive to their discrimination and thus, through studies, have the existing spectral difference between the crop and the weed patches, to perform agrochemical applications on the specific site without any waste (Peña *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2019; Yang, 2020; Radoglou, *et al.*, 2020).

For these reasons, this research was carried out to discriminate weeds based on the spectral response of the corn crop, to know the exact location of the weeds and thus propose alternatives for the management and sustainable use of chemicals such as herbicides. Therefore, with the direct application of herbicides in the weed patches, time, operational costs will be reduced and there will be a smaller amount of agrochemicals causing positive effects on the soil and the environment (Jiménez *et al.*, 2020; Sishodia *et al.*, 2020).

## Materials and methods

### Location of the study area

This research was carried out in the Ecuadorian coast, Manabí province, Santa Ana canton, Lodana parish, at the facilities of the Universidad Técnica de Manabí, campus of the Facultad de Ingeniería Agrícola, on a corn crop (*Zea mays*), located between geographic coordinates 1°10'30.3"S

causando efectos positivos en el suelo y en el medio ambiente (Jiménez *et al.*, 2020; Sishodia *et al.*, 2020).

## Materiales y métodos

### Ubicación del área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en la Costa ecuatoriana, provincia de Manabí, cantón Santa Ana, de la parroquia Lodana, en las instalaciones de la Universidad Técnica de Manabí, campus de la Facultad de Ingeniería Agrícola, sobre un cultivo de maíz (*Zea mays*), ubicado entre las coordenadas geográficas 1°10'30,3" S y 80°23'06,05" W a 61 m.s.n.m., tal como se muestra en la figura 1.

and 80°23'06.05"W at 61 m.a.s.l., as shown in Figure 1.

### Crop description

The corn crop covered an area of 21,631.2 m<sup>2</sup>, this was sown at the beginning of the rainy season, February 16, 2020, with a distance between rows of 1 m, and between plants of 0.30 m, maintaining a surface irrigation technology.

### Obtaining images

The images were taken using the *EBEE SQ*® unmanned aerial vehicle (UAV), instrumented with the *Parrot Sequoia*® camera, which captures images in the visible and multispectral green (GREEN), Red (RED), Red Edge bands. (EDGE) and Near Infrared

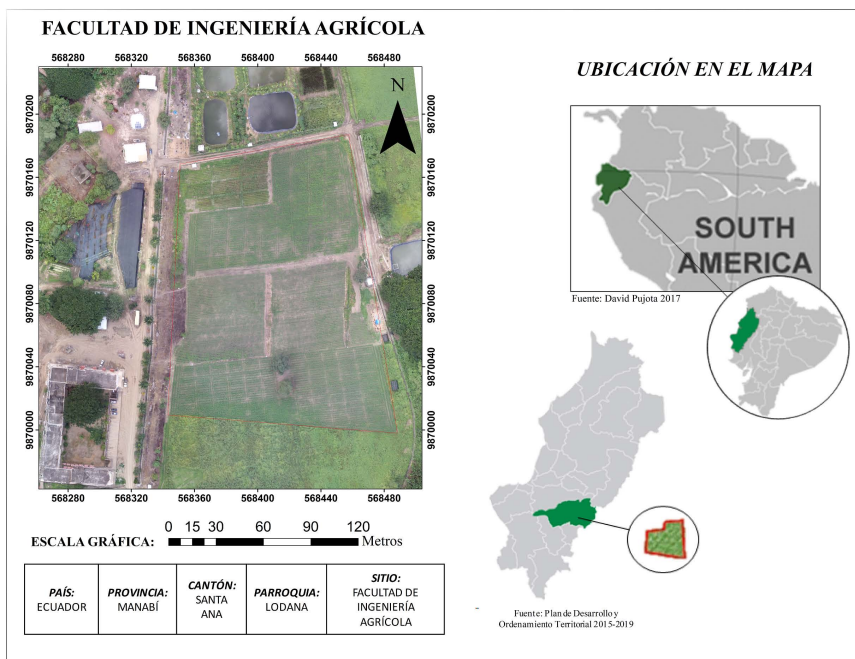


Figura 1. Ubicación del área de estudio.

Figure 1. Location of the study area.

**Descripción del cultivo**

El cultivo de maíz cubría un área de 21631,2 m<sup>2</sup>, este fue sembrado al inicio de la época de lluvia, 16 de febrero de 2020, con un distanciamiento entre hilera de 1 m, y entre planta de 0,30 m, manteniendo una tecnología de riego superficial.

**Obtención de imágenes**

Se procedió a la toma de las imágenes mediante el vehículo aéreo no tripulado (UAV) *EBEE SQ*, instrumentado con la cámara *Parrot Sequoia*, la cual captura imágenes en el visible y las bandas multiespectrales verde (GREEN), Roja (RED), Borde Rojo (EDGE) e Infrarrojo cercano (NIR), (SenseFly a Parrot Company, 2018; Parrot Drone SAS, 2020).

**Planificación del vuelo**

La planificación del vuelo se ejecutó con el software *Emotion AG*, en el cual se definió el área de trabajo, la altura de vuelo, resolución del pixel, solapamiento de las imágenes, así como el punto de despegue y aterrizaje. Los parámetros para los casos específicos del vuelo se muestran en el cuadro 1 y figura 2.

(NIR), (SenseFly a Parrot Company, 2018; Parrot Drone SAS, 2020).

**Flight planning**

The flight planning was executed with the *Emotion AG*® software, in which the work area, flight height, pixel resolution, image overlap, as well as the take-off and landing point were defined. Parameters for specific flight cases are shown in Table 1 and Figure 2.

The flight was kept under constant supervision with the modem signal, to verify that the equipment conditions were working properly and that high precision was achieved in the mission and a safe flight, guaranteeing the performance and quality of the data.

**Image processing**

The images were processed by *Pix4D*® photogrammetry software, with which georeferenced, orthomosaic digital models in 2D and 3D were created, and separated spectral bands, of high precision from the drone images (*Pix4D SA.*, 2019).

This process was developed

**Cuadro 1. Parámetros obtenidos por el software Emotion AG para la ejecución del vuelo.**

**Table 1. Parameters obtained by the Emotion AG software for the execution of the flight.**

Información	Emotion AG
Cámara	RGB (16 Mpix) + Multiespectral (1.2 Mpix)
Tipo	Sequoia 1.7.1
Tamaño de la imagen (cm/pixel)	11,00 cm/px
Tiempo obturación (s)	15:47 min
Área de vuelo	24,2 ha
Traslapo longitudinal (%)	80
Traslapo transversal (%)	70
Altura de vuelo (m)	150 m
Velocidad de vuelo (m s <sup>-1</sup> )	4 m/seg





**Figura 2. Planificación del vuelo en la zona de estudio.**

**Figure 2. Flight planning in the study area.**

El vuelo se mantuvo en constante supervisión con la señal del modem, para verificar que las condiciones de los equipos funcionaran apropiadamente y se consiguió una alta precisión en la misión y un vuelo seguro, garantizando el rendimiento y calidad de los datos.

#### **Procesamiento de las imágenes**

Las imágenes fueron procesadas por el software de fotogrametría *Pix4D*, con el cual se crearon modelos digitales en 2D y 3D georreferenciados, ortomosaicos y bandas espectrales separadas, de alta precisión a partir de las imágenes de drones (Pix4D SA., 2019).

Este proceso se desarrolló en tres etapas, la primera fue la calibración de las imágenes individuales, la Triangulación Aérea (AAT) y Ajuste de Bloque de Paquete (BBA); en la segunda se llevó a cabo la generación de nubes de puntos y malla, y la

in three stages, the first was the calibration of the individual images, the Aerial Triangulation (AAT) and Packet Block Adjustment (BBA). In the second, the generation of point and mesh clouds and the construction of the Digital Surface Model (MDS) were carried out. Finally, the third, it was possible to obtain the orthomosaic and the reflectance in each of the bands. This processing was configured to run automatically in the software.

#### **Calculation of vegetation indices**

Using the map algebra tools of the *ArcGIS*® software, the calculations of five vegetation indices (table 2) were performed, which allowed discrimination between the soil, weed patches and the corn crop in the study area.

#### **Supervised classification**

This method used the tools of the *ArcGIS*® software. For this, the

construcción del Modelo Digital de Superficie (MDS); por último, la tercera, se logró obtener el ortomosaico y la reflectancia en cada una de las bandas. Este procesamiento se configuró para su ejecución automática en el software.

**Cálculo de índices de vegetación**

Mediante las herramientas de álgebra de mapas del software ArcGIS se realizaron los cálculos de cinco índices de vegetación (cuadro 2), que permitieron la discriminación entre el suelo, los parches de maleza y el cultivo de maíz en el área de estudio.

NGRDI index was selected, which allowed the best identification of pixels colorimetry of each cells in the image. In this, a Shape file was built with the training areas of each of the coverages considered, for the recognition of the different categories.

Then the different classes were identified as bare soil, corn crop, weeds and the spectral signature file was generated with the software’s “*Creature Signatures*” algorithm.

Later with the algorithm “*Maximum Likelihood Classification*”, the classes for the whole image were generated using the signatures

**Cuadro 2. Índices de vegetación obtenido en el estudio.**

**Table 2. Vegetation indices obtained in the study.**

Índice	Relación entre bandas	Referencia
“Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada”	$NDVI = \frac{NIR - RED}{NIR + RED}$	(Rouse <i>et al.</i> , 1973)
“Vegetación de Diferencia Normalizada Verde”	$GNDVI = \frac{NIR - GREEN}{NIR + GREEN}$	(Wu <i>et al.</i> , 2014)
“Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada Ajustada al Suelo”	$NDVIAS = \frac{EDGE - RED}{EDGE + RED} (1 + L)$ <i>L = Factor corrección brillo del suelo</i>	(Filella y Penuelas 1994; Qi <i>et al.</i> , 1994)
“Índice de Diferencia Normalizada de Borde Rojo”	$NDRE = \frac{NIR - EDGE}{NIR + EDGE}$	(Li <i>et al.</i> , 2014)
“Índice de Diferencia Normalizada Verde-Rojo”	$NGRDI = \frac{(GREEN - RED)}{(GREEN + RED)}$	(Song and Park 2020)

**Clasificación supervisada**

Este método utilizó las herramientas del programa informático ArcGIS. Para ello se seleccionó el índice NGRDI, el cual permitió identificar de la mejor manera la colorimetría de los píxeles de cada una de las celdas en la imagen. En este se construyó un archivo Shape con las áreas de entrenamiento de cada

previously created. Finally, the accuracy of the classification was verified using the Kappa index.

**Results and discussion**

**Obtaining the images**

The *Parrot Sequoia*® multispectral camera from UAV *EBEE SQ*®, captured 379 photos with a pixel size

una de las coberturas consideradas, para el reconocimiento de las distintas categorías.

Luego se identificó las diferentes clases como suelo desnudo, cultivo de maíz, malezas y se generó el archivo de firmas espectrales con el algoritmo "Creature Signatures" del software.

Posteriormente con el algoritmo "Maximum Likelihood Classification", se generaron las clases para toda la imagen usando las firmas antes creadas. Por último, se verificó la precisión de la clasificación por medio del índice de Kappa.

## Resultados y discusión

### Obtención de las imágenes

La cámara multiespectral *Parrot Sequoia* de *UAV EBEE SQ*, capturó 379 fotos con un tamaño de los píxeles de 11,00 cm, registradas en los formatos JPEG para la imagen RGB y las bandas multiespectrales "GREEN, RED, NIR, EDGE" en Geotiff. Estos resultados son consistentes con los reportes de Franzini *et al.* (2019), quienes ratifican la consistencia geométrica y radiométrica de imágenes multiespectrales de *Parrot Sequoia*, que permitió a los investigadores adquirir imágenes de excelente calidad para la obtención de mapas (NDVI) con buenos resultados, resaltando la utilidad del sensor para fines agrícolas.

### Procesamiento de las imágenes

En la primera etapa el software *PixAD* generó como resultado un informe de calidad, donde reportó 73035 puntos característicos por imágenes, lo que permitió una muy

de 11.00 cm, recorded in the JPEG formats for the RGB image and the multispectral bands "GREEN, RED, NIR, EDGE" in Geotiff. These results are consistent with the reports by Franzini *et al.* (2019), who ratify the geometric and radiometric consistency of multispectral images of *Parrot Sequoia*®, which allowed researchers to acquire excellent quality images for obtaining maps (NDVI) with good results, highlighting the usefulness of the sensor for agricultural purposes.

### Image processing

In the first stage, the *PixAD*® software generated a quality report as a result, where it reported 73,035 characteristic points per images, which allowed a very good reconstruction and optimization of the initial parameters of the camera and with an excellent image matching. In the report, a very high overlap could be seen in much of the image, which confirmed that these images were taken in the correct position (figure 3).

According to research by Kharuf *et al.* (2018), consider that the *PixAD*® program is a tool with a high potential and flexibility in the creation of orthomosaics for the realization of remote sensing studies, it also allows the generation of vegetation indices offering reliable results.

The point cloud and textured mesh shows a preview of the orthomosaic and the Digital Surface Model (Figure 4). In addition, the four spectral bands GREEN, RED, EDGE and NIR were obtained, in "\*.TIF" format files.

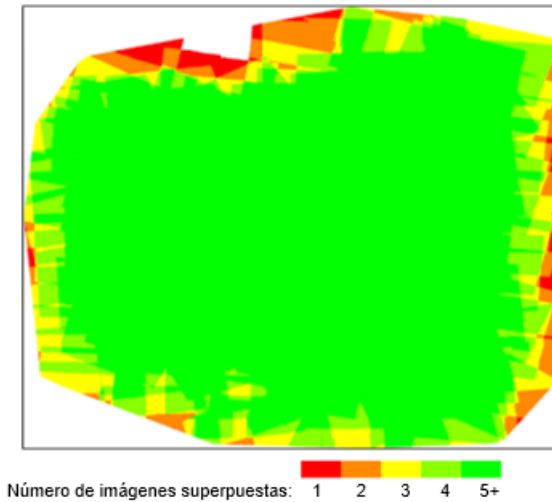
These results allow users to have quality images, because they have been automatically corrected in the

buena reconstrucción y optimización de los parámetros iniciales de la cámara y con un excelente emparejamiento de imágenes. En el reporte, se pudo visualizar un solapamiento muy alto en gran parte de la imagen, lo que confirmó que estas imágenes fueron tomadas en una posición correcta (figura 3).

positioning of the X, Y and Z axes (Lárraga *et al.*, 2019; Stott *et al.*, 2020).

**Calculation of vegetation indices**

The data in table 3 show the descriptive statistics for the 5 indices calculated. The value of the indices shows different hydric, nutritional,



**Figura 3. Mapa de solapamiento del área de estudio obtenido por el reporte de calidad del Pix4D.**

**Figure 3. Overlapping map of the study area obtained by the Pix4D quality report.**

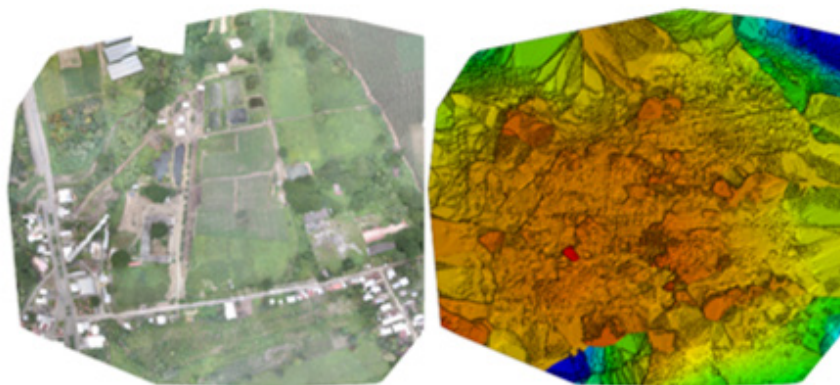
Según investigaciones de Kharuf *et al.* (2018), consideran que el programa *Pix4D* es una herramienta con un alto potencial y flexibilidad en la creación de ortomosaicos para la realización de estudios de teledetección, además permite la generación de índices de vegetación ofreciendo resultados confiables.

phytosanitary conditions and different densities of the vegetation cover. Studies carried out by Muñoz (2013) and Berrío *et al.* (2015), establish that these spectral values tend to measure the biomass or plant vigor within a pixel.

The visual interpretation of the indices allowed to discriminate the

La nube de puntos y malla texturizada muestra una vista previa del ortomosaico y el Modelo Digital de Superficie (figura 4). Además, se obtuvo las cuatro bandas espectrales GREEN, RED, EDGE y NIR, en ficheros de formato “\*.TIF”.

soil covers, but with greater ease in the case of the NGRDI (Green-Red Normalized Difference Index), which turned out to be very evident the discrimination of weeds, soils and crops (figure 5). Regarding this issue, a previous investigation is reported,



**Figura 4. Ortomosaico RGB y Modelo Digital de Superficie (MDS) generado por el programa informático Pix4D a partir de imágenes aéreas UAV.**

**Figure 4. RGB Orthomosaic and Digital Surface Model (MDS) generated by Pix4D software from UAV aerial images.**

Estos resultados permiten a los usuarios disponer de imágenes de calidad, porque han sido automáticamente corregidas en posicionamiento de los ejes X, Y y Z (Lárraga *et al.*, 2019; Stott *et al.*, 2020).

#### **Cálculo de índices de vegetación**

Los datos del cuadro 3 muestran los estadísticos descriptivos para los 5 índices calculados.

where it was found that the NGRDI presented the best results for the detection of grass weeds in rice fields (Barrero and Perdomo, 2018).

Although studies carried out by Castillejo-González *et al.* (2014) establish that the NDVI was the most appropriate index to separate the vegetation, that is, the cultivation of wild oats with the weeds; however, these results disagree with this

**Cuadro 3. Valores espectrales de los índices de vegetación en el cultivo de maíz.****Table 3. Spectral values of the vegetation indices in the corn crop.**

Índice	Promedio	Mínimo	Máximo	Desv. Est.
NDVI	0,977031	0,879261	0,993752	0,013842
NVDIAS	0,990727	0,090030	1,322890	0,206870
NGRDI	0,248019	-0,321352	0,593482	0,129516
NDRE	0,898981	0,829736	0,945052	0,007607
GNDVI	0,965510	0,845403	0,985863	0,009696

Desv. Est.= Desviación estándar.

Desv. Est.. = Standard deviation.

El valor de los índices muestra diferentes condiciones hídricas, nutricionales, fitosanitarias y distintas densidades de la cobertura vegetal. Estudios realizados por Muñoz (2013) y Berrío *et al.* (2015), establecen que estos valores espectrales tienden a medir la biomasa o vigor vegetal dentro de un pixel.

La interpretación visual de los índices permitió discriminar las coberturas del suelo, pero con una mayor facilidad para el caso del NGRDI (Índice de Diferencia Normalizada Verde-Rojo), el cual resultó ser muy evidente la discriminación de malezas, suelos y cultivos (figura 5). Respecto a este tema se reporta una investigación previa, donde se encontró que el NGRDI presentó los mejores resultados para la detección de malezas gramíneas en campos de arroz (Barrero y Perdomo, 2018).

research, where new NDVI, NVDIAS, NDRE, GNDVI indices were developed and it was found that these indices visually caused difficulties in the interpretation to distinguish and identify the vegetation cover (crop) with weeds, such as It is shown in figures 6, 7, 8 and 9. Thus, these figures combine the pixels of the vegetation cover of the ground and the weeds, as they do not show a separation of the same, and there is a saturation of green colorimetry, for hence, it was established that the NGRDI was the best in this study.

#### **Supervised classification**

Figure 10 represents the raster image of the classified NGRDI index, where it shows good results to separate the different covers and it manages to discriminate very well the weeds of the crops and the bare soil. The Supervised Classification develops iterative processes by comparing the sum of the squared

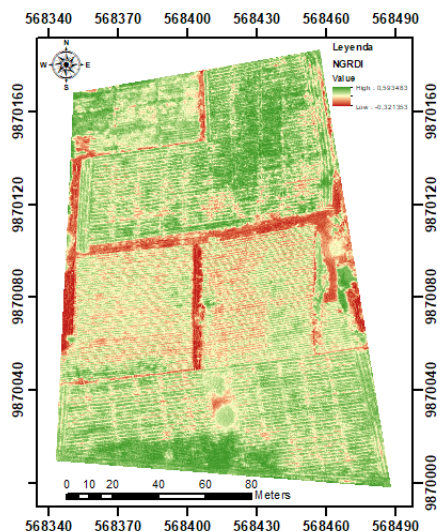


Figura 5. Cultivo de maíz aplicando el índice NGRDI.

Figure 5. Corn cultivation applying the NGRDI index.

Aunque estudios realizados por Castillejo-González *et al.* (2014) establecen que el NDVI fue el índice más apropiado para separar la vegetación, es decir, el cultivo de avena silvestre con la maleza; sin embargo, esos resultados discrepan con esta investigación, donde se desarrollaron nuevos índices NDVI, NVDIAS, NDRE, GNDVI y se encontró que estos índices visualmente provocaron dificultades en la interpretación para distinguir e identificar la cobertura vegetal (cultivo) con las malezas, tal como se muestra en las figuras 6, 7, 8 y 9. De modo que, estas figuras combinan los píxeles de la cobertura vegetal del suelo y la maleza, al no evidenciar una separación de las misma, y al existir saturación de colorimetría verde, por ende, se estableció que el NGRDI fue el mejor en este estudio.

deviations between classes with the average values (ArcGIS, 2016).

With the classification, it was possible to accurately identify the exact site where the weeds are found, which can facilitate the planning of agronomic control treatments. As can be seen in figure 10, the central plots of the corn crop present small patches of weed (yellow), while in the plots of the upper and lower part of the image large patches of weed are observed (red), which it causes the crop to compete enormously for acquisition of water and nutrients for its growth.

In figure 10 weed was easily discriminated, being able to differentiate its abundance. Therefore, it is corroborated that the supervised classification process obtained a lot of validation since it reached 0.93 of concordance, very good in the Kappa

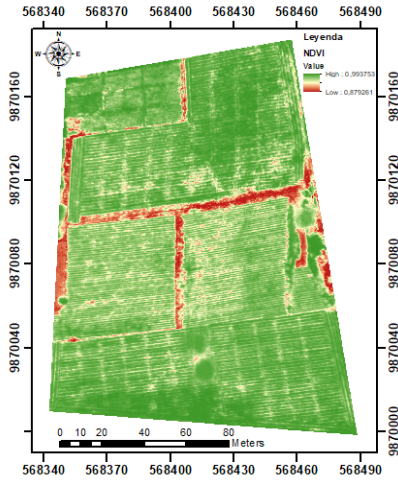


Figura 6. Cultivo de maíz aplicando el índice NDVI.

Figure 6. Corn crop applying the NDVI index.

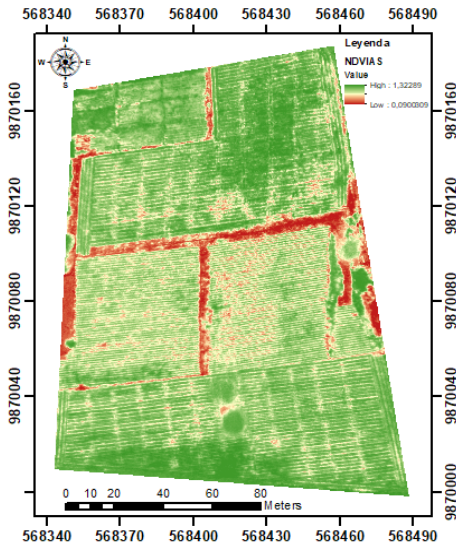


Figura 7. Cultivo de maíz aplicando el índice de NDVIAS.

Figure 7. Corn crop applying the NDVIAS index.



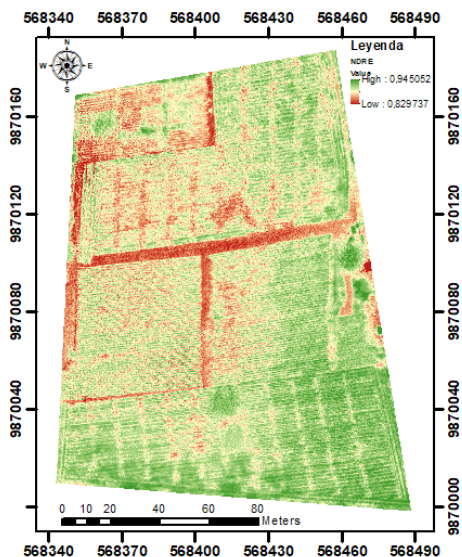


Figura 8. Cultivo de maíz aplicando el índice de NDRE.

Figure 8. Corn crop applying the NDRE index.

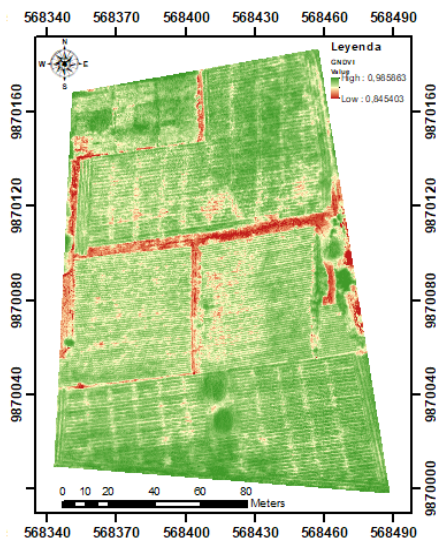


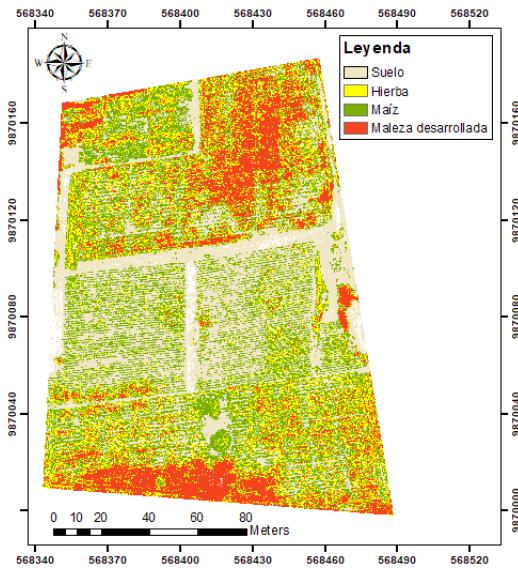
Figure 9. Corn cultivation applying the GNDVI index.

Figura 9. Cultivo de maíz aplicando el índice GNDVI

**Clasificación supervisada**

La figura 10 representa la imagen raster del índice NGRDI clasificada, donde muestra buenos resultados para separar las diferentes coberturas y logra discriminar muy bien las malezas de los cultivos y el suelo desnudo. La Clasificación Supervisada, desarrolla procesos iterativos al comparar la suma de las desviaciones cuadradas entre clases con los valores promedios (ArcGIS, 2016).

index and a precision of 93 %. With these results, the efficiency of the method is ratified, which has also been used in the research of Polanco (2012), who carried out a supervised classification in the Belmira páramo with Landsat images, which allowed him to identify the various classes of land use coverage from the soil, in addition this method presented a precision of 80 % and a Kappa index = 0.8.



**Figure 10. Maize, soil and weed crop coverage maps by supervised classification.**

**Figura 10. Mapas de cobertura del cultivo de maíz, suelo y malezas mediante la clasificación supervisada.**

Con la clasificación se logró identificar con precisión el sitio exacto donde se encuentran las malezas, lo cual puede facilitar la planificación de tratamientos agronómicos de control. Como se observa en la figura

On the other hand, these results (figure 10) allowed to know the percentages of the coverage of each class (table 4) and with this it was determined that 38 % of the crop area is affected by the presence of herbs

10, las parcelas centrales del cultivo de maíz presentan pequeños parches de maleza (amarillo), mientras que en las parcelas de la parte superior e inferior de la imagen se observan grandes manchas de maleza (rojo), lo cual ocasiona que el cultivo compita enormemente por la adquisición de agua y nutrientes para su crecimiento.

En la figura 10 la maleza se logró discriminar con facilidad, pudiendo diferenciar su abundancia. Por ello se corrobora que el proceso de la clasificación supervisada obtuvo mucha validación ya que alcanzó el 0,93 de concordancia, muy buena en el índice de Kappa y una precisión del 93%. Con estos resultados se ratifica la eficiencia del método, que también ha sido utilizado en la investigación de Polanco (2012), quien realizó una clasificación supervisada en el páramo de Belmira con imágenes Landsat, lo cual le permitió identificar las diversas clases de coberturas del uso del suelo, además este método presentó una precisión del 80% y un índice de Kappa = 0,8.

Por otro lado, estos resultados (figura 10) permitieron conocer los porcentajes de las coberturas de cada clase (cuadro 4) y con ello se determinó que el 38% del área del cultivo, está afectada por la presencia de hierbas (20%) y maleza desarrollada (18%), además de encontrar su ubicación exacta dentro del área de estudio.

Esta información permite mejorar significativamente las prácticas agronómicas, por cuanto se podría planificar con precisión la cantidad, el momento y lugar exacto para la aplicación del control de malezas,

(20 %) and developed weed (18 %), in addition to finding its exact location within the study area.

This information makes it possible to significantly improve agronomic practices, since the exact amount, time and place for the application of weed control could be planned with precision, detecting the different coverage of land use, and especially the weeds within the crops, which is a major challenge for precision agriculture (De Castro *et al.*, 2020).

## Conclusions

Of the indices analyzed, the NGRDI “Green-Red Normalized Difference Index” was the one that managed to show in a more efficient way the spatial distribution of weeds, crop and soil.

Through the supervised classification of spectral indices, the coverage percentages in each of the classes were determined.

In the study area, herbs cover 20 %, while the more developed weeds 18 % of the cultivation area.

By knowing the exact location of the weeds, it is also possible to determine the surface they occupy, which contributes to programming control treatments in specific sites with the precision of the amount of herbicides that must be applied and consequently in reducing economic costs. and environmental as established by precision agriculture.

*End of English Version*

detectando las distintas coberturas del uso del suelo, y sobre todo las malezas dentro de los cultivos, lo

cual es un importante desafío para la agricultura de precisión (De Castro *et al.*, 2020).

**Cuadro 4. Valores de las áreas cubiertas por el método de clasificación supervisada.**

**Table 4. Values of the areas covered by the supervised classification method.**

Clase	Área (m <sup>2</sup> )	Porcentaje (%)
Suelo	7.030,83	32
Hierba	4.232,79	20
Maíz	6.487,73	30
Maleza desarrollada	3.879,85	18

**Conclusión**

De los índices analizados el NGRDI “Índice de Diferencia Normalizada Verde-Rojo” fue el que logró mostrar de manera más eficiente la distribución espacial de las malezas, el cultivo y el suelo.

Mediante la clasificación supervisada de los índices espectrales se determinó los porcentajes de cobertura en cada una de las clases.

En la zona de estudio las hierbas cubren el 20%, mientras que la maleza más desarrollada el 18% del área de cultivo.

Al conocer la ubicación exacta de las malezas también se logra determinar la superficie que estas ocupan, lo cual contribuye a programar tratamientos de control en sitios específicos con la precisión de la cantidad de herbicidas que debe ser aplicado y consecuentemente en la disminución de los costos económicos y ambientales según lo establece la agricultura de precisión.

**Literatura citada**

Adão, T., J. Hruška, L. Pádua, J. Bessa, E. Peres, R. Morais and J. Sousa. 2017. Hyperspectral Imaging: A Review on UAV-Based Sensors, Data Processing and Applications for Agriculture and Forestry. *Journal Remote Sens.* 9(11), 2-30.

ArcGIS. 2016. Método de clasificación. Plataforma de representación cartográfica. Disponible en: <https://doc.arcgis.com/es/maps-for-office/4.0/design-and-use/classification-methods.htm>. Fecha de consulta: agosto 2020.

Barrero, O. and S. Perdomo. 2018. RGB and multispectral UAV image fusion for Gramineae weed detection in rice fields. *Journal Precision Agric.* 19, 809–822.

Berrió, V., J. Mosquera y D. Alzate. 2015. Uso de drones para el análisis de imágenes multiespectrales en agricultura de precisión. *Rev. Cienc. Tec. Aliment.* 13(1), 28-40.

Campos, J., M. Gallart, J. Llop, R. Salcedo, P. Ortega, E. Armengol y E. Gil. 2019. Comprobación de un sistema de aplicación variable basado en mapas de vegetación obtenidos con un vehículo aéreo no tripulado (UAV).

- Huesca. Universidad Politécnica de Cataluña. X Congreso Ibérico de Agroingeniería. Disponible en: <https://zaguan.unizar.es/record/84473/files/3431.pdf>. Fecha de consulta: marzo 2020.
- Castillejo-González, I., Peña-Barragán, J., Jurado-Expósito, M., Mesas-Carrascosa, F., and López-Granados, F. 2014. Evaluation of pixel- and object-based approaches for mapping wild oat (*Avena sterilis*) weed patches in wheat fields using QuickBird imagery for site-specific management. *European Journal of Agronomy*. 59(3), 57-66.
- Cevallos, H., L. Vargas y J. Vargas. 2019. Uso de índices espectrales en la agricultura de precisión: caso de estudio campus de la Facultad Técnica de Machala. *Rev. Alternativas*. 19(1), 71-79.
- De Castro, A., J. Peña, J. Torres, F. Jiménez, F. Valencia, J. Recasens and F. López. 2020. Mapping *Cynodon Dactylon* Infesting Cover Crops with an Automatic Decision Tree-OBIA Procedure and UAV Imagery for Precision Viticulture. *Remote Sensing of Environment*. 12(56), 2-23.
- Franzini, M., G. Ronchetti, G. Sona and V. Casella. 2019. Geometric and radiometric consistency of Parrot Sequoia multispectral images for precision agricultural applications *mdpi magazine*. *Journal Appl. Sci.*, 9(24), 1-24.
- Filella, I. and J. Penuelas. 1994. The red edge position and shape as indicators of plant chlorophyll content, biomass and hydric status. *Journal Remote Sens.*, 15(7), 1459-1470.
- Jiménez, Á., D. Camargo y D. García. 2020. Sistema inteligente para el manejo de malezas en cultivos de piña con conceptos de agricultura de precisión. *Rev. Cienc. y Agric.* 17(3), 122-136.
- Kharuf, S., L. Hernández, R. Orozco, O. Aday y I. Delgado. 2018. Análisis de imágenes multiespectrales adquiridas con vehículos aéreos no tripulados. *Rev. Ing. Elec. Autom. Comun.* 39(2), 79-91.
- Lárraga, H., A. Piedad, D. Hernández y E. Guerrero. 2019. Modelo de clasificación espacial de textura aplicada a unidades de vegetación. *Rev. Tectzapic*. 5(2), 29-39.
- Li, F., Y. Miaoa, G. Fengc, F. Yuand, S. Yuea and X. Gaoa. 2014. Improving estimation of summer maize nitrogen status with red edge-based spectral vegetation indices. *Journal Field Crops Research*, 157, 111-123.
- Martínez, N., y E. Barrera. 2020. Ecofisiología de la germinación de tres malezas efímeras periurbanas en Morelia, Michoacán, México. *Rev. La Granja*. 31(1), 47-55.
- Muñoz, P. 2013. Índices de vegetación. Apuntes de Teledetección. Disponible en: <http://bibliotecadigital.ciren.cl/bitstream/handle/123456789/26389/Tema%20Indices%20de%20vegetaci%C3%B3n%20de%20Pedro%20Mu%C3%B1oz%20A.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Fecha de consulta: julio del 2020.
- Páliz, C., M. Vera, M. Goyes, F. Beltrán y M. López. 2019. Costes, beneficios y rentabilidad en el cultivo de maíz. Primera Edición. Centro de Investigación y Desarrollo Profesional. Babahoyo, 94p.
- Parrot Drone SAS. 2019. Parrot Sequoia. Manual de Especificaciones Técnicas. Disponible en: [http://www.uavsensefly.cl/PDF/Ficha\\_Tecnica\\_Sequoia\\_V2.pdf](http://www.uavsensefly.cl/PDF/Ficha_Tecnica_Sequoia_V2.pdf). Fecha de consulta: febrero 2020.
- Peña, J., J. Torres-Sánchez, A. Serrano y F. López. 2014. Detección de malas hierbas en girasol en fase temprana mediante imágenes tomadas con un vehículo aéreo no tripulado (UAV). *Rev. de Teledet.* 42(1), 39-47.
- Pérez, L., C. Castañeda, M. Ramos y J. Tafoya. 2014. Control químico preemergente de la maleza en tomate de cáscara. *Rev. Interciencia*, 39(6), 422-427.
- Pix4D SA. 2019. Pix4D Mapper. Software en fotogrametría para mapeo profesional con drones. Disponible en: <https://www.pix4d.com/es/producto/pix4dmapper-fotogrametria-software>. Fecha de consulta: marzo 2020.
- Polanco, J. 2012. Teledetección de la vegetación del páramo de Belmira








- con imágenes Landsat. Rev. DYNA, 79(171), 222-231.
- Qi, J., A. Chehbouni, A. Huete, Y. Kerr and S. Sorooshian. 1994. A Modified Soil Adjusted Vegetation Index. Remote Sens. Environ. 48, 119-126.
- Radoglou, P., P. Sarigiannidis, T. Lagkas and L. Moscholios. 2020. A Compilation of UAV Applications for Precision Agriculture. Journal Computer Networks 172, 1-18
- Rouse, J., Haas, R., Schell, J., and Deering, D. 1973. Monitoring the vernal advancement and retrogradation (green wave effect) of natural vegetation. Index DataBase. Disponible en: <https://www.indexdatabase.de/db/r-single.php?id=675>. Fecha de consulta: mayo del 2020.
- Saavedra, D., A. Cubillos, L. Machado, V. Murcia y D. Méndez. 2018. Análisis de índices de vegetación en el cultivo de arroz en la finca La Tebaida del Municipio de Campoalegre. Rev. La Angostura. 5(5), 19-28.
- Santana, F., S. Trueba, A. Villafuerte, W. Vera, C. Bravo y R. Bravo. 2020. Evaluación de la selectividad del herbicida Pledge, en mezcla con pre-emergentes en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). Rev. Cienc. e Inv. 5(1), 75-89.
- SenseFly a Parrot Company. 2018. The advanced agricultural drone. Handbook. Disponible en: <https://geo-matching.com/uploads/default/m/i/migrationpv4pzg.pdf>. Fecha de consulta: febrero 2020.
- Sishodia, R., R. Ray and S. Singh. 2020. Applications of Remote Sensing in Precision Agriculture: A Review. Journal Remote Sens. 12(19), 2-31.
- Song, B. and K. Park. 2020. Detection of Aquatic Plants Using Multispectral UAV Imagery and Vegetation Index. J. Remote Sens 12, 2-16.
- Stott, E., R. Williams and T. Hoey. 2020. Ground Control Point Distribution for Accurate Kilometre-Scale Topographic Mapping Using an RTK-GNSS Unmanned Aerial Vehicle and SfM Photogrammetry. Journal Drones. 4(55), 1-21.
- Wu, W., W. Al-Shafie, A. Mhaimed, F. Ziadat, V. Nangia and W. Payne. 2014. Soil Salinity Mapping by Multiscale Remote Sensing in Mesopotamia, Iraq. IEEE J. Sel. Top. App. Earth Obs. Remote Sens., 7(11), 4442-4452.
- Yang, C. 2020. Precision agricultural technologies and remote sensing for the detection and management of crop diseases with a practical application example. Journal Engineering. 6(5), 528-532.

## Foliar fertilization of sodium selenite and its effects on yield and nutraceutical quality in grapevine

Fertilización foliar con selenito de sodio y su efecto sobre el rendimiento y calidad nutracéutica en el cultivo de vid

Fertilização foliar com selenita de sódio e seu efeito sobre o rendimento e qualidade nutracêutica no cultivo de videiras

María de los Ángeles Sariñana-Navarrete<sup>1</sup>, Luis Guillermo Hernández-Montiel<sup>2</sup>, Esteban Sánchez-Chavez<sup>3</sup>, Juan José Reyes-Perez<sup>4</sup>, Bernardo Murillo-Amador<sup>2</sup>, Arturo Reyes-González<sup>5</sup>, Pablo Preciado-Rangel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Torreón. Carretera Torreón-San Pedro km 7.5, Ejido Ana. Torreón, Coahuila, 27170, México. Correos electrónicos: (MA) [est\\_primo23@hotmail.com](mailto:est_primo23@hotmail.com); ; (PP) [ppreciador@yahoo.com.mx](mailto:ppreciador@yahoo.com.mx); . <sup>2</sup>Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Av. Instituto Politécnico Nacional 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, Baja California Sur, 23096, México. Correos electrónicos: (LG) [hernandez@cibnor.mx](mailto:hernandez@cibnor.mx); ; (BM) [bmurillo04@cibnor.mx](mailto:bmurillo04@cibnor.mx); . <sup>3</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Delicias, Avenida Cuarta Sur No. 3820 Fraccionamiento Vencedores del Desierto, Delicias, Chihuahua, México Chihuahua, México. Correo electrónico: (ES) [esteban@ciad.mx](mailto:esteban@ciad.mx) . <sup>4</sup>Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Av. Quito. Km 1 ½ vía a Santo Domingo. Quevedo, Los Ríos, Ecuador. Correo electrónico: (JJ) [jreyes@uteq.edu.ec](mailto:jreyes@uteq.edu.ec); . <sup>5</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Blvd. José Santos Valdez No: 1200 pte. Matamoros, Coahuila, 27440, México. Correo electrónico: (AG) [reyes.arturo@inifap.gob.mx](mailto:reyes.arturo@inifap.gob.mx); .

### Abstract

Selenium (Se) is an essential micronutrient for humans, but in plants, this essentiality has not been demonstrated. However, the supplementation of Se in crops has been shown to improve the yield and the quality of the edible part. The objective of this research was to evaluate the effect of Se foliar fertilization on yield, nutraceutical quality and Se accumulation in grape. Five doses of Se ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  at 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 and 1.25  $\text{mg.L}^{-1}$ ) and a control were evaluated.

Received: 16-11-2020 • Accepted: 01-02-2021.

\*Corresponding autor. Email: [ppreciador@yahoo.com.mx](mailto:ppreciador@yahoo.com.mx)

The results obtained showed that the application in low doses of Se increased the yield; high doses increase nutraceutical quality and induced the accumulation of Se in grapes. In conclusion, the grapevine is a crop with the potential to be biofortified and improve the quality of grape.

**Keywords:** *Vitis vinifera*; plant nutrition; selenium; phytochemical compounds.

### Resumen

El selenio (Se) es un micronutriente esencial para el ser humano, pero en las plantas, esta esencialidad no se ha demostrado. Sin embargo, la suplementación de Se en los cultivos ha demostrado mejorar el rendimiento, y la calidad de la parte comestible. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la fertilización foliar de Se sobre el rendimiento, calidad nutracéutica y la acumulación de Se en bayas de uva. Se evaluaron cinco dosis de Se ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  a 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 y 1,25  $\text{mg.L}^{-1}$ ) y un control. Los resultados obtenidos mostraron que la aplicación en dosis bajas de Se incrementó el rendimiento; en contraste dosis altas mejoran la calidad nutracéutica e inducen la acumulación de Se en las uvas. En conclusión, la vid es un cultivo con potencial de ser biofortificado y mejorar calidad de las bayas de uva.

**Palabras clave:** *Vitis vinifera*; nutrición de las plantas; selenio; compuestos fitoquímicos.

### Resumo

O selênio (Se) é um micronutriente essencial para humanos, mas em plantas essa essencialidade não foi demonstrada. No entanto, a suplementação de Se nas lavouras tem mostrado melhorar o rendimento e a qualidade da parte comestível. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da adubação foliar com Se na produtividade, qualidade nutracéutica e acúmulo de Se em bagos de uva. Foram avaliadas cinco doses de Se ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  a 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 y 1,25  $\text{mg.L}^{-1}$ ) e um controle. Os resultados mostraram que a aplicação de baixa dose de aumento de desempenho; Em contrapartida, altas doses melhoram a qualidade nutracéutica e induzem o acúmulo de se em uvas. Em conclusão, a videira é uma cultura com potencial para ser bioesperificada e melhorar a qualidade das frutas de uva.

**Palavras-chave:** *Vitis vinifera*; nutrição de plantas; selênio; compostos fitoquímicos.

### Introduction

Selenium (Se) is an important mineral in human nutrition and is essential to form vital proteins and enzymes such as glutathione

### Introducción

El selenio (Se) es un mineral importante en la nutrición humana y es esencial para formar proteínas y enzimas vitales tales como: glutatión



peroxidase, thyroxine 5-deiodinase and selenoprotein. It also has antioxidant properties and protects against free radicals and various carcinogenic factors (Ducsay *et al.*, 2016). According to the World Health Organization, Se consumption in the human diet should be between 55 to 200  $\mu\text{g day}^{-1}$  per adult (WHO, 2009). The most common way in which the human organism acquires Se is by consumption of foods, such as meat or fish (Willers *et al.*, 2015). In the world, there is one billion people with Se deficiencies, due to the consumption of primarily plant-based diets (Wu *et al.*, 2015); plants contain low concentrations of Se, because this mineral is found in small quantities in the soil (Ponavic and Scheib, 2014). Biofortification increases the absorption and accumulation of specific nutrients, *e.g.*, Se, in agricultural food products through plant breeding, genetic engineering and synthetic fertilization (Bocchini *et al.*, 2018). In recent years, studies on the biofortification have increased Se concentration in plants offering the potential to increase Se intake by humans through the consumption of agricultural crops (Mora *et al.*, 2015). Foliar fertilization to agricultural crops is an alternative for incorporating Se into the food chain. Although Se is not considered essential to plants, it has been shown that at low concentrations Se increases crop growth, yield and antioxidant content (Gaucín-Delgado *et al.*, 2020) and its concentration in the edible part (Kuldeep *et al.*, 2010). One of the ways of applying Se to plants is through application of

peroxidasa, tiroxina 5-deiodinasa y selenoproteína. También posee propiedades antioxidantes y protege contra los radicales libres y diversos factores carcinógenos (Ducsay *et al.*, 2016). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, el consumo de Se en la dieta humana debe estar entre 55 a 200  $\mu\text{g día}^{-1}$  por adulto (WHO, 2009). La forma más común por la cual el organismo humano adquiere el Se es a través del consumo de alimentos, tales como la carne o el pescado (Willers *et al.*, 2015). En el mundo, existen mil millones de personas con deficiencias de Se, debido al consumo de dietas basadas en vegetales principalmente (Wu *et al.*, 2015); las plantas contienen bajas concentraciones de Se, ya que este mineral se encuentra en pequeñas cantidades en el suelo (Ponavic y Scheib, 2014). La biofortificación aumenta la absorción y la acumulación de nutrientes específicos como por ejemplo, el Se en los productos alimentarios agrícolas a través del fitomejoramiento, ingeniería genética y fertilización sintética (Bocchini *et al.*, 2018). En los últimos años, los estudios sobre la biofortificación han incrementado la concentración de Se en las plantas, ofreciendo el potencial de aumentar la ingesta de Se por parte de los seres humanos a través del consumo de cultivos agrícolas (Mora *et al.*, 2015). La fertilización foliar para los cultivos agrícolas es una alternativa para incorporar el Se a la cadena alimenticia. Aunque el Se no se considera esencial para las plantas, se ha demostrado que a bajas concentraciones el Se aumenta el crecimiento del cultivo, el rendimiento

sodium selenite ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ). Sodium selenite is effective, safe, and has proven to be more bioavailable to plants when applied directly to foliage than when incorporated into the soil (Kápolna *et al.*, 2009). The grape (*Vitis vinifera* L.), is considered to be a functional food because it contains glucose and fructose and has a high amount of phenolic compounds that have pharmacological, antimicrobial and antioxidant properties (Aviña de la Rosa *et al.*, 2016); contains vitamins A, C, E, B1, B3, B6 and B9, and minerals such as Ca, P, Na, K, Fe, Cu, Mg, and Zn. The shell and seed of grape contain polyphenols, vitamins C, E and flavonoids that provide protection against oxidative stress in human (Molina-Quijada *et al.*, 2010). Therefore, the objective of this study was the biofortification with Se in grapevine, and to evaluate its impact on the performance parameters, nutraceutical quality and the accumulation of Se in fruit.

## Materials and methods

### Study area

The experiment was carried out in 2018 in a commercial orchard located in Monterrey, Durango, Mexico at 25°29'20"N, 103°37'37"W. The climate of study area is dry steppe; average temperature of 21 °C and annual rainfall of 253 mm. The soil texture is sandy loam (81 % sand, 14 % silt and 5 % clay); bulk density 1.67 g.cm<sup>-3</sup>; pH of 8.37; water retention capacity of 25.2 %; electrical conductivity of 1.28 dS.m<sup>-1</sup>; organic matter content 1.18 mg.kg<sup>-1</sup>; total nitrogen of 32.8 mg.kg<sup>-1</sup>;

y el contenido antioxidante (Gaucín-Delgado *et al.*, 2020) y su concentración en la parte comestible (Kuldeep *et al.*, 2010). Una de las formas de aplicar el Se a las plantas es mediante la aplicación de selenito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ). El selenito de sodio es eficaz, seguro y ha demostrado ser más biodisponible para las plantas cuando se aplica directamente al follaje que cuando se incorpora al suelo (Kápolna *et al.*, 2009). La vid (*Vitis vinifera* L.) se considera un alimento funcional ya que contiene glucosa y fructuosa y tiene una alta cantidad de compuestos fenólicos que tienen propiedades farmacológicas, antimicrobianas y antioxidantes (Aviña de la Rosa *et al.*, 2016); contiene vitaminas A, C, E, B1, B3, B6 y B9, y minerales tales como Ca, P, Na, K, Fe, Cu, Mg, y Zn. La cáscara y la semilla de la uva contienen polifenoles, vitaminas C, E y flavonoides que proporcionan protección contra el estrés oxidativo en el ser humano (Molina-Quijada *et al.*, 2010). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue la biofortificación con Se en la vid, y evaluar su impacto en los parámetros de rendimiento, la calidad nutracéutica y la acumulación de Se en el fruto.

## Materiales y métodos

### Área de estudio

El experimento se llevó a cabo en el 2018, en un huerto comercial ubicado en Monterrey, Durango, México a 25°29'20"N, 103°37'37"W. El clima del área de estudio es de estepa seca; temperatura promedio de 21 °C y una precipitación anual de 253 mm. La

available phosphorus of 24.4 mg.kg<sup>-1</sup> and removable potassium of 90.43 mg.kg<sup>-1</sup>.

### Plantation

Grape “Cabernet Sauvignon” plants of 7 years old were used. The planting system was 1 m between plants and 3 m between rows, with a plant density 3,333 plant.ha<sup>-1</sup>.

### Selenite doses and application on grape plants

The sodium selenite (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 95 % purity, Sigma-Aldrich®) was prepared at 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 and 1.25 mg.L<sup>-1</sup> using distilled water, and a non-toxic commercial surfactant (INEX-A®, 2 mL.L<sup>-1</sup>). Sodium selenite solutions were applied (200 mL per plant) by foliar sprays using a manual sprinkler backpack (Truper®). Applications were conducted in the morning (at sunrise), during fruit formation, veraison, and 15 days before harvest. The control plants (0 mg.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) received only 200 mL per plant of distilled water. Each experimental plot consisted of 10 plants. The experiment was repeated twice.

### Yield and quality of grapes

Fruit yield, and bunches weight was measured in 10 plants per treatment. Fruit total soluble solids (TSS) and titratable acidity (TA) were determined in the juice of 50 fruit per treatment. TSS was measured with manual refractometer 0-32 % (Sper Scientific® 30001, Sper Scientific LTD, Scottsdale Az, USA) and expressed in °Brix. TA was determined following the methodology of AOAC (AOAC, 1990), using NaOH (0.1 N) and phenolphthalein (1 %) as an indicator; results expressed as percentage of

textura del suelo es franco arenosa (81% arena, 14% limo y 5% arcilla); densidad aparente 1,67 g.cm<sup>-3</sup>; pH de 8,37; capacidad de retención de agua del 25,2%; conductividad eléctrica de 1,28 dS.m<sup>-1</sup>; contenido de materia orgánica 1,18 mg.kg<sup>-1</sup>; nitrógeno total de 32,8 mg.kg<sup>-1</sup>; fósforo disponible de 24,4 mg.kg<sup>-1</sup> y potasio removible de 90,43 mg.kg<sup>-1</sup>.

### Plantación

Se utilizaron las plantas de vid “Cabernet Sauvignon” de 7 años de edad. El sistema de plantación fue de 1 m entre plantas y 3 m entre hileras, con una densidad de planta de 3.333 planta.ha<sup>-1</sup>.

### Dosis de selenito y aplicación en las plantas de vid

El selenito de sodio (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 95 % de pureza, Sigma-Aldrich®) se preparó a 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 y 1,25 mg.L<sup>-1</sup> utilizando agua destilada, y un surfactante comercial no tóxico (INEX-A®, 2 mL.L<sup>-1</sup>). Las soluciones de selenito de sodio se aplicaron (200 mL por planta) por aspersión foliar utilizando una mochila de aspersión manual (Truper®). Las aplicaciones se realizaron por la mañana (al amanecer), durante la formación del fruto, en enero y 15 días antes de la cosecha. Las plantas de control (0 mg.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) recibieron sólo 200 mL por planta de agua destilada. Cada parcela experimental constaba de 10 plantas. El experimento se repitió dos veces.

### Rendimiento y calidad de las uvas

Se midió el rendimiento de los frutos, y el peso de los racimos en 10 plantas por tratamiento. Se

tartaric acid per 100 g. Fruit volume was determined by water displacement in 50 fruit per treatment. Maturity index (MI) was calculated with the relationship TSS/TA.

## Nutraceutical fruit quality

### Polyphenol content

Total phenolic content was determined using a Folin-Ciocalteu method (García-Nava, 2009). Samples were quantified in an ultraviolet (UV)-Vis spectrophotometer at 760 nm (master spectrum FISHER SCIENTIFIC 415). The standard was prepared with gallic acid. Results were expressed in mg GAE.100 g<sup>-1</sup> fresh weight (FW).

### Flavonoids content

Total flavonoids were determined by colorimetry (García-Nava, 2009). Samples were quantified in a UV-Vis spectrophotometer at 510 nm (master spectrum Fisher Scientific 415). The standard was prepared with quercetin dissolved in absolute ethanol ( $y = 0.0122x - 0.0067$ ;  $R^2 = 0.965$ ). Results were expressed in mg QE.100 g<sup>-1</sup> FW.

### Antioxidant capacity

Total antioxidant capacity was measured by the in-vitro DPPH<sup>+</sup> method (Brand-Williams *et al.*, 1995). Samples were quantified in a UV-Vis spectrophotometer at 517 nm (master spectrum Fisher Scientific 415). The standard was prepared with Trolox (0.1-1.0 mM,  $R^2 = 0.998$ ). Results were expressed in  $\mu$ M equivalent in Trolox.100 g<sup>-1</sup> FW.

### Selenium accumulation in fruits

The Se concentration in fruits was determined by atomic absorption

determinaron los sólidos solubles totales de la fruta (SST) y la acidez titulable (AT) en el zumo de 50 frutas por tratamiento. Los SST se midieron con un refractómetro manual 0-32 % (Sper Scientific® 30001, Sper Scientific LTD, Scottsdale Az, USA) y se expresaron en °Brix. La AT se determinó siguiendo la metodología de AOAC (AOAC, 1990), usando NaOH (0,1 N) y fenoltaleína (1 %) como indicador; los resultados se expresaron como porcentaje de ácido tartárico por 100 g. El volumen de los frutos se determinó por desplazamiento de agua en 50 frutos por tratamiento. El índice de madurez (IM) se calculó con la relación SST/TA.

## Calidad nutracéutica del fruto

### Contenido de polifenoles

El contenido fenólico total se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (García-Nava, 2009). Las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro ultravioleta (UV)-Vis a 760 nm (master spectrum FISHER SCIENTIFIC 415). El estándar se preparó con ácido gálico. Los resultados se expresaron en mg GAE.100 g<sup>-1</sup> peso fresco (PF).

### Contenido de flavonoides

Se determinaron los flavonoides totales por colorimetría (García-Nava, 2009). Las muestras se cuantificaron en un Espectrofotómetro UV-Vis a 510 nm (master spectrum Fisher Scientific 415). El estándar se preparó con quercetina disuelta en etanol absoluto ( $y = 0,0122x - 0,0067$ ;  $R^2 = 0,965$ ). Los resultados se expresaron en mg QE.100 g<sup>-1</sup> PF.

spectrophotometry (Varian SpectrAA, modelo 220Fast) using the methodology reported by Silva-Trejos, (2011). Fifty fruits per treatment were used and the results were expressed in  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  dry weight (DW).

**Statistical analysis**

Data were analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey’s HSD multiple range test with a significance level of 5 %, using Statistica v. 10.0 (StatSoft, 2011).

**Results and discussions**

**Yield and quality of grapes**

The foliar application of different doses of sodium selenite to grapevine affected the fruit yield per plant, bunches weight, titratable acidity and grape volume (Table 1).

**Capacidad antioxidante**

La capacidad antioxidante total se midió por el método in vitro de DPPH+ (Brand-Williams *et al.*, 1995). Las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro UV-Vis a 517 nm (master spectrum Fisher Scientific 415). El estándar se preparó con Trolox (0,1-1,0 mM,  $r^2 = 0,998$ ). Los resultados se expresaron en  $\mu\text{M}$  equivalente en Trolox.100  $\text{g}^{-1}$  PF.

**Acumulación de selenio en los frutos**

La concentración de Se en los frutos se determinó por espectrofotometría de absorción atómica (Varian SpectrAA, modelo 220Fast) utilizando la metodología reportada por Silva-Trejos, (2011). Se usaron cincuenta frutos por tratamiento y los resultados se expresaron en  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  peso seco (PS).

**Table 1. Effect of doses of sodium selenite applied foliar on fruit yield, total soluble solids (TSS), titratable acidity (TA), and fruit volume in grape ‘Cabernet Sauvignon’ var.**

**Cuadro 1. Efecto de las dosis de selenito de sodio aplicadas por vía foliar sobre el rendimiento del fruto, los sólidos solubles totales (SST), la acidez titulable (AT) y el volumen del fruto en la uva var ‘Cabernet Sauvignon’.**

$\text{Na}_2\text{SeO}_3$ (mg.L <sup>-1</sup> )	Fruit yield. plant <sup>-1</sup> (kg)	Bunches weight (g)	TSS (°Brix)	TA (%)	Maturity index	Fruit volume (cc)
0.25	2.18 <sup>a</sup>	77.74 <sup>ab</sup>	22.0 <sup>a</sup>	6.84 <sup>a</sup>	3.21 <sup>a</sup>	1.11 <sup>d</sup>
0.50	2.34 <sup>a</sup>	76.26 <sup>ab</sup>	22.3 <sup>a</sup>	6.59 <sup>b</sup>	3.39 <sup>ab</sup>	1.17 <sup>cd</sup>
0.75	1.25 <sup>ab</sup>	58.14 <sup>c</sup>	22.7 <sup>a</sup>	6.60 <sup>b</sup>	3.43 <sup>ab</sup>	1.26 <sup>c</sup>
1.00	1.24 <sup>ab</sup>	61.80 <sup>bc</sup>	22.3 <sup>a</sup>	6.61 <sup>b</sup>	3.37 <sup>ab</sup>	1.45 <sup>b</sup>
1.25	0.76 <sup>b</sup>	58.34 <sup>bc</sup>	23.0 <sup>a</sup>	6.60 <sup>b</sup>	3.48 <sup>b</sup>	1.62 <sup>a</sup>
Control	2.17 <sup>a</sup>	80.96 <sup>a</sup>	22.3 <sup>a</sup>	6.77 <sup>a</sup>	3.30 <sup>ab</sup>	1.07 <sup>d</sup>

a, b, c, d: Different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) according to Tukey’s HSD test.

a, b, c, d: Different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) according to Tukey’s HSD test.

Yield and bunch weight decrease 27.17 and 64.49 respectively; instead, the grape volume increased 51 %. The TSS did not show differences among treatments. The treatments with 0.25 and 1.25 mg.L<sup>-1</sup> of sodium selenite increased maturity index between 3.21 and 3.48 in the grape. In species such as lettuce, potato and tomato, highlight that the application of low doses of Se (10 µM) had growth promoting effects, while higher concentrations induced symptoms of toxicity in plants (Schiavon *et al.*, 2013). Se is not considered essential in plant metabolism; therefore, the addition of this element is not expected to change the crop yield (Broadley *et al.*, 2006). However, other studies reported that the application of Se in low concentration causes positive effects on yield, biomass production, among other (Zhu *et al.*, 2017). In contrast, high doses of Se cause toxicity in the plants because there is a high production of reactive oxygen species, found to inhibit growth and performance (Lapaz *et al.*, 2019). The studies previously reported support our results that there is a decrease in grape production with higher concentrations of Se. Another study found a decrease of more than 21 % in tomato crop yield with high doses of NPs-Se (Hernández-Hernández *et al.*, 2019). In general, the response of the plant to Se differs according to the applied concentration (Puccinelli *et al.*, 2017a), the sensitivity of the species (Lyons *et al.*, 2005), the chemical species of Se used and the method of application; then, the optimal doses for each culture must be determined

## Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba de rango múltiple HSD de Tukey con un nivel de significancia del 5 %, utilizando Statistica v. 10.0 (StatSoft, 2011).

## Resultados y discusión

### Rendimiento y calidad de las uvas

La aplicación foliar de diferentes dosis de selenito de sodio a la vid afectó al rendimiento de frutos por planta, el peso de los racimos, la acidez titulable y al volumen de la uva (Cuadro 1).

El rendimiento y el peso del racimo disminuyeron un 27,17 y un 64,49 respectivamente; en cambio el volumen de la uva aumentó un 51 %. El SST no mostró diferencias entre los tratamientos. Los tratamientos con 0,25 y 1,25 mg.L<sup>-1</sup> de selenito de sodio aumentaron el índice de madurez en la uva entre 3,21 y 3,48. En especies tales como la lechuga, la papa y el tomate se destaca que la aplicación de dosis bajas de Se (10 µM) tuvo efectos promotores del crecimiento, mientras que a concentraciones más altas indujeron síntomas de toxicidad en las plantas (Schiavon *et al.*, 2013). El Se no se considera esencial en el metabolismo de las plantas; por lo tanto, no se espera que la adición de este elemento modifique el rendimiento del cultivo (Broadley *et al.*, 2006). Sin embargo, otros estudios reportaron que la aplicación de Se en bajas cantidades causa efectos positivos en el rendimiento,

(Oliveira *et al.*, 2018). In previous studies, Se enrichment can have a positive influence on fruit ripening and sugar metabolism. In fact, recent studies conducted on *Camellia sinensis* leaves have demonstrated a positive correlation between Se concentration and soluble sugars and the sweetness index (Zhao *et al.*, 2016), suggesting that Se could play a role in acceleration ripening of fruit. Similarly, the rest of the Se doses did not produce any significant effect on TSS compared to the control; however, the TSS values were in the range of 20 to 26 %, similar to other reported results (Weaver, 1985). Other studies reported a relationship between TSS and TA (Zhu *et al.*, 2017). Furthermore, a TA decrease was found in grapes treated with Se. The decrease in TA is attributed to malic acid, which is used as a substrate for the synthesis of sugars and for respiration during ripening (Ruffner, 1982). Variation in Se availability for plants has often been associated with impaired sulfur absorption, leading to changes in the synthesis of secondary metabolites (Malagoli *et al.*, 2015). Walteros *et al.* (2012) discussed that the aromatic compounds and sugar/acid content are two elements important in the flavor of the grapes and that the maturity index between 3 and 3.5 suggest the commercial maturity of the fruit.

### **Nutraceutical quality of grapes**

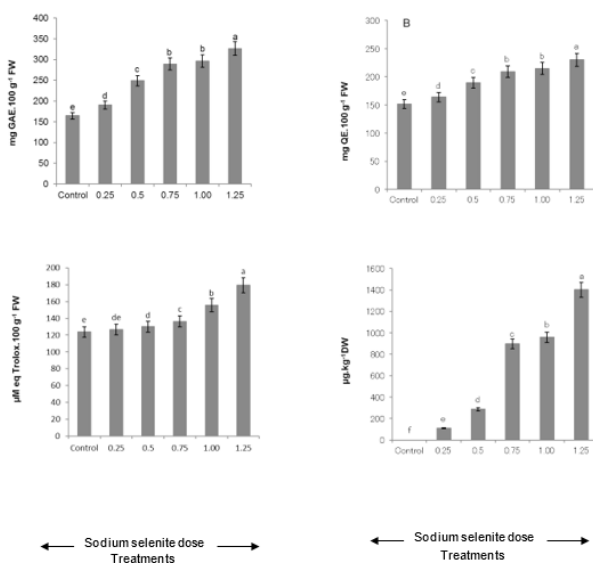
#### **Total phenolic, flavonoids and antioxidant capacity**

Phenols concentration in grape fruits increased as doses of sodium

producción de biomasa, entre otros (Zhu *et al.*, 2017). Por el contrario, altas dosis de Se causan toxicidad en las plantas ya que existe una alta producción de especies reactivas de oxígeno, que se han descubierto que inhiben el crecimiento y el rendimiento (Lapaz *et al.*, 2019). Los estudios previamente reportados apoyan nuestros resultados sobre que existe una disminución en la producción de uva con mayores concentraciones de Se. Otro estudio encontró una disminución de más del 21 % en el rendimiento del cultivo de tomate con altas dosis de NPs-Se (Hernández-Hernández *et al.*, 2019). En general, la respuesta de la planta al Se difiere en función de la concentración aplicada (Puccinelli *et al.*, 2017a), de la sensibilidad de las especies (Lyons *et al.*, 2005), de la especies químicas de Se utilizadas y el método de aplicación; entonces, se deben determinar las dosis óptimas para cada cultivo (Oliveira *et al.*, 2018). En estudios previos, el enriquecimiento con Se puede tener una influencia positiva en la maduración de la fruta y en el metabolismo de los azúcares. De hecho, estudios recientes realizados en hojas de *Camellia sinensis* han demostrado una correlación positiva entre la concentración de Se, los azúcares solubles y el índice de dulzor (Zhao *et al.*, 2016), lo que sugiere que el Se podría desempeñar un papel en la aceleración de la maduración del fruto. Del mismo modo, el resto de las dosis de Se no produjeron ningún efecto significativo sobre el SST en comparación con el control; sin embargo, los valores de SST estuvieron

selenite increased. Compared with control treatment, the phenols concentration increase of 98 % when 1.25 mg.L<sup>-1</sup> of sodium selenite was applied (Figure 1A). High concentration of Se increased total flavonoids in grape fruits by 52 % (Figure 1B). The foliar application of 1.25 mg.L<sup>-1</sup> of Se increased the total antioxidant capacity in grape fruits by 44 % (Figure 1C).

en el rango de 20 al 26 %, similar a otros resultados reportados (Weaver, 1985). Otros estudios informaron de una relación entre el SST y la AT (Zhu *et al.*, 2017). Además, se encontró una disminución de la AT en las uvas tratadas con Se. La disminución de la AT se atribuye al ácido málico, que se utiliza como sustrato para la síntesis de azúcares y para la respiración durante la maduración



**Figure 1. Effect of doses of sodium selenite on content of phenolic content (A), total flavonoids (B), antioxidant capacity (C), and Se concentration (D) in grape fruits. Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation (SD) ( $n = 50$ ). Columns with different letters were significantly different according to Tukey's HSD test ( $p < 0.05$ ).**

**Figura 1. Efecto de las dosis de selenito de sodio sobre el contenido fenólico total (A), los flavonoides totales (B), la capacidad antioxidante (C), y la concentración de Se (D) en los frutos de uva. Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar (SD) ( $n = 50$ ). Las columnas con letras diferentes fueron significativamente diferentes según la prueba HSD de Tukey ( $p < 0,05$ ).**



The biofortification significantly increases the amount of essential elements in the edible part of plant, which is consistent with what has been reported previously (Garduño-Zepeda and Márquez-Quiroz, 2018). Several studies have also highlighted the contrasting effects of Se fertilization on the concentration of total phenols, either positive or negative, depending on the plant species and the Se concentration applied (Schiavon *et al.*, 2013). In the case of grapes, the concentration of total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant capacity was affected by the biofortification of Se. There is evidence that the cause is the positive regulation of the phenylpropanoid biosynthetic pathway which leads to the accumulation of specific metabolites that belong to a class of flavonoids and polyphenols (Mimmo *et al.*, 2017), and play a central role in determining the organoleptic characteristics and antioxidant capacity of grapes.

Phenols are the third most abundant component in grapes, distributed mainly in the seeds and in the shell of the berries (Rousserie *et al.*, 2019). Phenolic compounds, in addition to their astringent properties (Molina-Quijada *et al.*, 2010), participate as natural antioxidants in food, characterizing themselves in functional foods (Porrás-Loaiza and López-Malo, 2009). In grapes, whose final destination is wine production, the presence of these compounds determines the quality, since it gives them the oxidative capacity necessary to maintain the characteristic red color (Valls *et al.*, 2000).

(Ruffner, 1982). La variación en la disponibilidad de Se para las plantas se ha asociado a menudo con la alteración de la absorción de azufre, lo que conduce a cambios en la síntesis de metabolitos secundarios (Malagoli *et al.*, 2015). Walteros *et al.* (2012) discutieron que los compuestos aromáticos y el contenido de azúcar/ácido son dos elementos importantes en el sabor de las uvas y que el índice de madurez entre 3 y 3,5 sugiere la madurez comercial de la fruta.

### **Calidad nutracéutica de las uvas**

#### **Fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante**

La concentración de fenoles en los frutos de uva aumentó a medida que se incrementaban las dosis de selenito de sodio. En comparación con el tratamiento de control, la concentración de fenoles aumentó un 98 % cuando se aplicó 1,25 mg. L<sup>-1</sup> de selenito de sodio (Figura 1A). La alta concentración de Se aumentó los flavonoides totales en los frutos de uva en un 52 % (Figura 1B). La aplicación foliar de 1,25 mg.L<sup>-1</sup> de Se aumentó la capacidad antioxidante total en los frutos de uva en un 44 % (Figura 1C).

La biofortificación aumenta significativamente la cantidad de elementos esenciales en la parte comestible de la planta, lo que coincide con lo reportado anteriormente (Garduño-Zepeda y Márquez-Quiroz, 2018). Varios estudios también han destacado que los efectos contrastados de la fertilización con Se sobre la concentración de los fenoles totales, positivos o negativos depende de las especies vegetales y de la concentración de Se aplicada (Schiavon *et al.*, 2013).

Studies support the increase in the content of phenolic compounds with the application of Se, reporting an increase of 8.07 % in the total phenolic content in pomegranate fruits (*Punica granatum*) when performing foliar applications of 1 and 2  $\mu\text{M}$  Se and NPs-Se (Zahedi *et al.*, 2019). In garlic (*Allium sativum* L.) a study found a positive response in the total phenolic content by foliar application of Se, with an increase of 82.23 % compared to the control (Shafiq *et al.*, 2019). Another study reported that the increase in phenolic compounds was showed with the application of stimulants during fruit veraison (Jeong *et al.*, 2004). Although the context is not clearly defined, mechanisms of action of Se in plant metabolism have been proposed. One of them is through the biosynthetic pathway of organic compounds such as phenylpropanoid, which leads to the accumulation of secondary metabolites (Zahedi *et al.*, 2019).

Flavonoids are bioactive compounds contained in all foods (Porrás-Loaiza and López-Malo, 2009) and these groups of compounds are especially relevant in wine quality (Valls *et al.*, 2000). Its structure gives them an antioxidant capacity, providing protection against oxidative damage in cells and also has a positive effect in a number of pathologies, including heart disease, atherosclerosis and cancer (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Regarding the total content of flavonoids, a study reveals that there is evidence of an effect of trace elements such as Se on the antioxidant capacity of plants

En el caso de las uvas, la concentración de los compuestos fenólicos totales, flavonoides y la capacidad antioxidante se vio afectada por la biofortificación de Se. Existen evidencias de que la causa es la regulación positiva de la vía biosintética de los fenilpropanoides que conduce a la acumulación de metabolitos específicos que pertenecen a una clase de flavonoides y polifenoles (Mimmo *et al.*, 2017), y desempeñan un papel central en la determinación de las características organolépticas y la capacidad antioxidante de las uvas.

Los fenoles son el tercer componente más abundantes en la uva, distribuidos principalmente en las semillas y en la cáscara de las bayas (Rousserie *et al.*, 2019). Los compuestos fenólicos, además de tener propiedades astringentes (Molina-Quijada *et al.*, 2010), participan como antioxidantes naturales en los alimentos, caracterizándose en alimentos funcionales (Porrás-Loaiza y López-Malo, 2009). En las uvas, cuyo destino final es la producción de vino, la presencia de estos compuestos determina la calidad, ya que les confiere la capacidad oxidativa necesaria para mantener el color rojo característico (Valls *et al.*, 2000).

Los estudios apoyan el aumento en el contenido de compuestos fenólicos con la aplicación de Se, reportando un aumento de 8,07 % en el contenido fenólico total en frutos de granada (*Punica granatum*) al realizar aplicaciones foliares de 1 y 2  $\mu\text{M}$  de Se y NPs-Se (Zahedi *et al.*, 2019). En ajo (*Allium sativum* L.) un estudio encontró una respuesta positiva en el

(Blasco *et al.*, 2008). To explain this behavior, three synergistic transport mechanisms have been proposed in flavonoid biosynthesis, transport mediated by vesicle traffic, via membrane transporters, and transport mediated by the enzyme Glutathione-S-transferase (GST) (Rousserie *et al.*, 2019). The latter, in turn, uses a cysteine residue (Cys), which is an amino acid where Se can replace sulfur, and form selenocysteine (Se-Cys) (Casals-Mercadal *et al.*, 2005). Other studies aimed at increasing the total flavonoid content by the application of micronutrients have obtained favorable results. For example, a study reports a 63 % increase in total flavonoids in garlic (*Allium sativum* L.) due to the application of Se (Shafiq *et al.*, 2019).

The antioxidant capacity of fruits and vegetables is influenced by the total phenolic content (Franco-Bañuelos *et al.*, 2019). In this research, a positive correlation ( $r = 0.82$ ) was found between total antioxidant capacity and total phenolic compounds. Zahedi *et al.* (2019), reports an increase of 18.24 % in the antioxidant capacity in pomegranate (*Punica granatum*) because of foliar application of Se. In the same way, an increase in the antioxidant capacity of tomato seeds and seedlings when Se was provided by nutrient solution and foliar spray was reported (de los Santos-Vázquez *et al.*, 2016). Plant species contain a complex antioxidant defense network, where the most important compounds are ascorbate, glutathione, tannins, flavonoids and carotenoids, which provide protection against oxidative

contento fenólico total por aplicación foliar de Se, con un incremento del 82,23 % respecto al control (Shafiq *et al.*, 2019). Otro estudio reportó que el aumento en los compuestos fenólicos se mostró con la aplicación de estimulantes durante el envero de la fruta (Jeong *et al.*, 2004). Aunque el contexto no está claramente definido, se han propuesto mecanismos de acción del Se en el metabolismo vegetal. Uno de ellos es a través de la vía biosintética de compuestos orgánicos como el fenilpropanoide, que conduce a la acumulación de metabolitos secundarios (Zahedi *et al.*, 2019).

Los flavonoides son compuestos bioactivos contenidos en todos los alimentos (Porrás-Loaiza y López-Malo, 2009) y estos grupos de compuestos son especialmente relevantes en la calidad del vino (Valls *et al.*, 2000). Su estructura les confiere una capacidad antioxidante, proporcionando protección contra el daño oxidativo en las células y también tiene un efecto positivo en una serie de patologías, incluyendo enfermedades cardíacas, aterosclerosis y cáncer (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). En cuanto al contenido total de flavonoides, un estudio revela que existe evidencia de un efecto de oligoelementos como el Se en la capacidad antioxidante de las plantas (Blasco *et al.*, 2008). Para explicar este comportamiento, se han propuesto tres mecanismos de transporte sinérgicos en la biosíntesis de los flavonoides, el transporte mediado por el tráfico de vesículas, a través de transportadores de membrana, y el transporte mediado

stress (Peralta-Pérez and Volke-Sepúlveda, 2012). These compounds are classified according to their nature, and some mineral elements such as Cu, Zn, Mn, Fe and Se act as cofactors in the production of antioxidant compounds (Porrás-Loaiza and López-Malo, 2009); e.g. the enzyme Glutathione peroxidase, where Se is a structural part of each of the four catalytic centers (Casals-Mercadal *et al.*, 2005).

### Selenium concentration in fruits

Selenium concentration in grapefruits increased linearly ( $y=290.11x-406.21$   $R^2=0.9478$ ) as doses of Se increased (Figure 1D). The use of  $1.25 \text{ mg.L}^{-1}$  of Se favored an accumulation of his element in grape fruits. This accumulation is 12.72 times more than obtained in the lowest dose evaluated. The accumulation of Se in edible parts of some biofortified plant products has been reported in some studies with increases of about 30 % in Se (Zhu *et al.*, 2017). In general, the accumulation of Se through plant metabolic pathways, not only depends on the species to which the element is being applied, but also on the chemical compound used and the way in which it is supplied (Li *et al.*, 2018).

Although Se is not an essential element for plant species, given its affinity for Sulfur, this element can replace inside the plant metabolism by Se, because it exists in the same oxidation states (Broadley *et al.*, 2006), creating the hypothesis that it can fulfill biological functions of great benefit (Puccinelli *et al.*, 2017a) and obtain an additional

por la enzima glutatión-S-transferasa (GST) (Rousserie *et al.*, 2019). Esta última, a su vez, utiliza un residuo de cisteína (Cys), que es un aminoácido en el que el Se puede sustituir al azufre, y formar selenocisteína (Se-Cys) (Casals-Mercadal *et al.*, 2005). Otros estudios dirigidos a aumentar el contenido total de flavonoides mediante la aplicación de micronutrientes han obtenido resultados favorables. Por ejemplo, un estudio informa de un aumento del 63 % de los flavonoides totales en el ajo (*Allium sativum* L.) debido a la aplicación de Se (Shafiq *et al.*, 2019).

La capacidad antioxidante de las frutas y vegetales está influenciada por el contenido fenólico total (Franco-Bañuelos *et al.*, 2019). En esta investigación, se encontró una correlación positiva ( $r = 0.82$ ) entre la capacidad antioxidante total y los compuestos fenólicos totales. Zahedi *et al.* (2019), reportan un aumento del 18,24 % en la capacidad antioxidante en granada (*Punica granatum*) debido a la aplicación foliar de Se. De la misma manera, se reportó un aumento en la capacidad antioxidante de las semillas y plántulas de tomate cuando se aplicó Se por una solución nutritiva y por aspersión foliar (de los Santos-Vázquez *et al.*, 2016). Las especies vegetales contienen una compleja red de defensa antioxidante, donde los compuestos más importantes son: ascorbato, glutatión, taninos, flavonoides y carotenoides, que proporcionan protección contra el estrés oxidativo (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012). Estos compuestos se clasifican según su naturaleza, y algunos

source of Se. Previous studies show that biofortification significantly increases the amount of essential elements in the edible part of plants (da Silva *et al.*, 2020). This study has demonstrated the ability of grapevine to accumulate Se in the edible part, from the smallest dose applied to the one with the highest concentration, which leaves open the possibility of including this plant species for future biofortification programs. In addition, the accumulation obtained from Se in grape fruits could supplement the daily intake recommended by the USDA (Puccinelli *et al.*, 2017b).

## Conclusions

Grapes appear to be a good target for Se biofortification to increase human intake of this essential micronutrient without affecting performance and quality parameters. In addition, the biofortification increases the content of Se, total phenolic compounds, flavonoids, and greater antioxidant capacity of grapes, which translates into an improvement in the synthesis of antioxidant compounds and their nutraceutical quality. Selenium enrichment could play a critical role in triggering metabolic pathways leading to an increase in compounds beneficial to health in humans.

---

### *End of English Version*

---

elementos minerales tales como Cu, Zn, Mn, Fe y Se actúan como cofactores en la producción de compuestos antioxidantes (Porrás-Loaiza y López-Malo, 2009); por ejemplo, la enzima

glutación peroxidasa, donde el Se forma parte estructural de cada uno de los cuatro centros catalíticos (Casals-Mercadal *et al.*, 2005).

## Concentración de selenio en los frutos

La concentración de selenio en las uvas aumentó linealmente ( $y=290,11x-406,21$   $R^2=0,9478$ ) a medida que aumentaban las dosis de Se (Figura 1D). El uso de  $1,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de Se favoreció una acumulación de este elemento en los frutos de uva. Esta acumulación es 12,72 veces superior a la obtenida en la dosis más baja evaluada. La acumulación de Se en las partes comestibles de algunos productos vegetales biofortificados ha sido reportada en algunos estudios con aumentos de alrededor del 30 % de Se (Zhu *et al.*, 2017). En general, la acumulación de Se mediante las vías metabólicas de las plantas, no solo depende de las especies en las cuales el elemento es aplicado, sino también del compuesto químico utilizado y de la forma en la que se suministra (Li *et al.*, 2018). Aunque el Se no es un elemento esencial para las especies vegetales, dada su afinidad por el Azufre, este elemento se puede sustituir dentro del metabolismo de la planta por el Se, ya que existe en los mismos estados de oxidación (Broadley *et al.*, 2006), creando la hipótesis de que puede cumplir funciones biológicas de gran beneficio (Puccinelli *et al.*, 2017a) y obtener una fuente adicional de Se. Estudios anteriores muestran que la biofortificación aumenta significativamente la cantidad de elementos esenciales en la parte comestible de las plantas (da Silva *et*

*al.*, 2020). Este estudio ha demostrado la capacidad de la vid para acumular Se en la parte comestible, desde la menor dosis aplicada hasta la de mayor concentración, lo que deja abierta la posibilidad de incluir esta especie vegetal para futuros programas de biofortificación. Además, la acumulación obtenida de Se en los frutos de la uva podría complementar la ingesta diaria recomendada por el USDA (Puccinelli *et al.*, 2017b).

## Conclusion

Las uvas parecen ser un buen objetivo para la biofortificación del Se con el fin de aumentar la ingesta humana de este micronutriente esencial sin afectar a los parámetros de rendimiento y calidad. Además, la biofortificación aumenta el contenido de Se, los compuestos fenólicos totales, los flavonoides y la mayor capacidad antioxidante de las uvas, lo que se traduce en una mejora de la síntesis de compuestos antioxidantes y de su calidad nutracéutica. El enriquecimiento con selenio podría desempeñar un papel fundamental en la activación de las vías metabólicas que conducen a un aumento de los compuestos beneficiosos para la salud en los seres humanos.

## Literature cited

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. Official Methods of Analysis, 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

Aviña de la Rosa, D. M. d. R., J. Carranza-Tellez, B. A. Vázquez-Huirtrón and J. Carranza-Concha. 2016. Capacidad

antioxidante y contenido fenólico de uva blanca (*Vitis vinifera* L.) sin semilla. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología en Alimentos. 1(1): 801-805.

- Blasco, B., J. Rios, L. Cervilla, E. Sánchez Rodríguez, J. Ruiz and L. Romero. 2008. Iodine biofortification and antioxidant capacity of lettuce: potential benefits for cultivation and human health. *Ann Appl Biol.* 152(3): 289-299.
- Bocchini, M., R. D'Amato, S. Ciancaleoni, M. Fontanella, C. A. Palmerini, G. M. Beone, A. Onofri, V. Negri, G. Marconi and E. Albertini. 2018. Soil selenium (Se) biofortification changes the physiological, biochemical and epigenetic responses to water stress in *Zea mays* L. by inducing a higher drought tolerance. *Front. Plant Sci.* 9; 389.
- Brand-Williams, W., M. Cuvelier and C. Berset. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28(1): 25-30.
- Broadley, M. R., P. J. White, R. J. Bryson, M. C. Meacham, H. C. Bowen, S. E. Johnson, M. J. Hawkesford, S. P. McGrath, F. J. Zhao and N. Breward. 2006. Biofortification of UK food crops with selenium. *P Nutr. Soc.* 65(2): 169-181.
- Casals-Mercadal, G., M. Torra-Santamaria, R. Deulofeu-Piquet and A. Ballesta-Gimeno. 2005. Importancia del selenio en la práctica clínica. *Química Clínica.* 24(3): 141-148.
- da Silva, D. F., P. E. Cipriano, R. R. de Souza, M. S. Júnior, V. Faquin, M. L. de Souza Silva and L. R. G. Guilherme. 2020. Biofortification with selenium and implications in the absorption of macronutrients in *Raphanus sativus* L. *J. Food Compos. Anal.* 86: 103382.
- de los Santos-Vázquez, M. E., A. Benavides-Mendoza, N. A. Ruiz-Torres, M. Cabrera-de la Fuente and Á. Morelos-Moreno. 2016. Sodium selenite treatment of vegetable

seeds and seedlings and the effect on antioxidant status. Emir J. Food Agr. 589-593.

Ducsay, L., O. Ložek, M. Marček, M. Varėnyiová, P. Hozlár and T. Lošák. 2016. Possibility of selenium biofortification of winter wheat grain. Plant Soil Environ. 62(8): 379-383.

Franco-Bañuelos, A., S. Hernández-Trujillo, C. S. Contreras-Martínez, J. Carranza-Téllez and J. Carranza-Concha. 2019. Use of growth regulators on the total phenolic content and the antioxidant capacity of "red globe" grape. Agrociencia. 53(6): 881-894.

García-Nava, M. A. 2009. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro Revista Académica 1: 1-4.

Garduño-Zepeda, A. and C. Márquez-Quiroz. 2018. Aplicación de selenio en cultivos agrícolas. Revisión bibliográfica. ITEA, información técnica económica agraria: revista de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario. 114(4): 327-343.

Gaucín-Delgado, J. M., L. G. Hernández-Montiel, E. Sánchez-Chávez, H. Ortega-Ortiz, M. Fortis-Hernández, J. J. Reyes-Pérez and P. Preciado-Rangel. 2020. Agronomic biofortification with selenium improves the yield and nutraceutical quality in tomato under soilless conditions. Not. Bot. Horti. Agrobot. 48(3): 1221-1232.

Hernández-Hernández, H., T. Quiterio-Gutiérrez, G. Cadenas-Pliego, H. Ortega-Ortiz A. D. Hernández-Fuentes, M. Cabrera de la Fuente, J. Valdés-Reyna and A. Juárez-Maldonado. 2019. Impact of selenium and copper nanoparticles on yield, antioxidant system, and fruit quality of tomato plants. Plants. 8(10): 355.

Jeong, S. T., N. Goto-Yamamoto, S. Kobayashi and M. J. P. S. Esaka. 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of

anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. Plant Sci. 167(2): 247-252.

Kápolna, E., P. R. Hillestrøm, K. H. Laursen, S. Husted and E. H. Larsen. 2009. Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot. Food Chem. 115(4): 1357-1363.

Kuldeep, V., A. Yadav, H. Singh and D. Yadav. 2010. Effect of foliar spray of nutrients on fruit drop, yield and quality attributes of mango fruit (*Mangifera indica* L.) cv-Amrapali. Plant Arch. 10: 359-360.

Lapaz, A. d. M., L. F. d. M. Santos, C. H. P. Yoshida, R. Heinrichs, M. Campos and A. R. D. Reis. 2019. Physiological and toxic effects of selenium on seed germination of cowpea seedlings. Bragantia. 78(4) :498-508.

Li, M., Z. Zhao, J. Zhou, D. Zhou, B. Chen, L. Huang, Z. Zhang and X. Liu. 2018. Effects of a foliar spray of selenite or selenate at different growth stages on selenium distribution and quality of blueberries. Journal of the Science of Food and Agriculture, 98(12), 4700-4706. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9004>

Lyons, G., I. Ortiz-Monasterio, J. Stangoulis and R. Graham. 2005. Selenium concentration in wheat grain: is there sufficient genotypic variation to use in breeding?. Plant Soil. 269(1-2): 369-380.

Malagoli, M., M. Schiavon, S. Dall'Acqua and E. A. Pilon-Smits. 2015. Effects of selenium biofortification on crop nutritional quality. Front. Plant Sci. 6: 280.

Martínez-Flórez, S., J. González-Gallego, J. M. Culebras and M. J. Tuñón. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición Hospitalaria. 17(6): 271-278.

Mimmo, T., R. Tiziani, F. Valentinuzzi, L. Lucini, C. Nicoletto, P. Sambo, M. Scampicchio, Y. Pii and S. Cesco. 2017. Selenium Biofortification in *Fragaria x ananassa*: Implications on Strawberry Fruits Quality, Content of Bioactive Health Beneficial Compounds and Metabolomic Profile. Front Plant Sci. 8: 1887.

- Molina-Quijada, D., L. Medina-Juárez, G. González-Aguilar, R. Robles-Sánchez and N. Gámez-Meza. 2010. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de cáscara de uva (*Vitis vinifera* L.) de mesa cultivada en el noroeste de México. Phenolic compounds and antioxidant activity of table grape (*Vitis vinifera* L.) skin from northwest Mexico. *CyTA-J Food*. 8(1): 57-63.
- Mora, M., P. Durán, J. Acuña, P. Cartes, R. Demanet and L. Gianfreda. 2015. Improving selenium status in plant nutrition and quality. *Journal of Soil Science Plant Nutrition*. 15(2): 486-503.
- Oliveira, V. C. d., V. Faquin, K. C. Guimarães, F. R. Andrade, J. Pereira and L. R. G. Guilherme. 2018. Agronomic biofortification of carrot with selenium. *Ciência e Agrotecnologia*. 42(2), 138-147. <https://doi.org/10.1590/1413-70542018422031217>
- Peralta-Pérez, M. d. R. and T. Volke-Sepúlveda. 2012. La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación. *Rev Mex Ing Quim*. 11(1): 75-88.
- Ponavic, M. and A. Scheib. 2014. Distribution of Selenium in European Agricultural and Grazing Land Soil. pp. 131-144. *In* "Chemistry of Europe's Agricultural Soils" (C. Reimann, M. Birke, A. Demetriades, P. Filzmoser and P. O'Connor, eds.), vol. 103.
- Porras-Loaiza, A. and A. López-Malo. 2009. Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 3(1): 121-134.
- Puccinelli, M., F. Malorgio and B. Pezzarossa. 2017a. Selenium Enrichment of Horticultural Crops. *Molecules*. 22: 933.
- Puccinelli, M., F. Malorgio, I. Rosellini and B. Pezzarossa. 2017b. Uptake and partitioning of selenium in basil (*Ocimum basilicum* L.) plants grown in hydroponics. *Sci Hortic*. 225: 271-276.
- Rousserie, P., A. I. Rabot and L. Geny-Denis. 2019. From Flavanols Biosynthesis to Wine Tannins: What Place for Grape Seeds?. *J. Agric. Food Chem*. 67(5): 1325-1343.
- Ruffner, H. 1982. Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: A review-Part B. *Vitis*. 21: 346-358.
- Schiavon, M., S. Dall'acqua, A. Mietto, E. A. Pilon-Smits, P. Sambo, A. Masi and M. Malagoli. 2013. Selenium fertilization alters the chemical composition and antioxidant constituents of tomato (*Solanum lycopersicon* L.). *J. Agric. Food Chem*. 61(44): 10542-10554.
- Shafiq, M., A. Qadir and S. Ahmad. 2019. Biofortification: A Sustainable Agronomic Strategy to Increase Selenium Content and Antioxidant Activity in garlic. *Appl Ecol Env Res*. 17(2): 1685-1704.
- Silva-Trejos, P. 2011. Validación de la metodología analítica para cuantificación de Selenio en alimentos de la canasta básica del costarricense. *Revista Costarricense de Salud Pública*. 20(1): 31-35.
- StatSoft Inc. 2011. *Statistica*. System reference. StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA.
- Valls, J., M. Lampreave, M. Nadal and L. Arola. 2000. Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. *Alimentacion Equipos y Tecnologia*. 19(2): 119-124.
- Walteros, I., D. Molano, P. J. Almanza, M. Camacho and S. González Almanza. 2012. Effect of pruning on chemical changes during fruit ripening of *Vitis vinifera* L. var. Cabernet Sauvign. *Cultura Científica*. 10: 8-15.
- Weaver, R. 1985. "Cultivo de Uva". Segunda Impresión. Editorial Continental, México.
- Willers, J., M. Heinemann, N. Bitterlich and A. Hahn. 2015. Intake of minerals from food supplements in a German population-a nationwide survey. *Food Nutrition Sciences*, 6(2), 205-215. <https://doi.org/10.4236/fns.2015.62021>





- World Health Organization (WHO). 2009. Global Health Risks: Mortality and Burden of Disease Attributed to Selected Major Risks. Retrieved March 5 from [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/GlobalHealthRisks\\_report\\_annex.pdf](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_annex.pdf)
- Wu, Z., G. S. Bañuelos, Z.-Q. Lin, Y. Liu, L. Yuan, X. Yin and M. Li. 2015. Biofortification and phytoremediation of selenium in China. *Front. Plant Sci.* 6: 1-8.
- Zahedi, S. M., M. S. Hosseini, N. D. H. Meybodi and J. A. T. da Silva. 2019. Foliar application of selenium and nano-selenium affects pomegranate (*Punica granatum* cv. Malase Saveh) fruit yield and quality. *S. Afr. J. Bot.* 124: 350-358.
- Zhao, H., J. Huang, Y. Li, X. Song, J. Luo, Z. Yu and D. Ni. 2016. Natural variation of selenium concentration in diverse tea plant (*Camellia sinensis*) accessions at seedling stage. *Sci. Hortic.* 198: 163-169.
- Zhu, S., Y. Liang, X. An, F. Kong, D. Gao and H. Yin. 2017. Changes in sugar content and related enzyme activities in table grape (*Vitis vinifera* L.) in response to foliar selenium fertilizer. *J. Sci. Food Agric.* 97: 4094-4102.

## Uso potencial de *Lupinus exaltatus* Zucc. (Leguminosae) como abono verde en suelos de Jalisco, México

Potential use of *Lupinus exaltatus* Zucc. (Leguminosae) as green manure in soils of Jalisco, Mexico

Uso potencial de *Lupinus exaltatus* Zucc. (Leguminosae) como adubo verde em solos de Jalisco, México

Juan Francisco Zamora Natera<sup>1</sup> e Isidro Zapata Hernández<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Botánica y Zoología. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. México. Correo electrónico [jfzamoranatera@gmail.com](mailto:jfzamoranatera@gmail.com),  <sup>2</sup>Estancia Posdoctoral. Universidad Autónoma de Chiapas-Facultad de Ciencias Agronómicas. Carretera Ocozocoautla-Villafloraes km 84.5, Villafloraes, Chiapas, México. CP. 30470. AP. 78. Correo electrónico: [chilo0602@hotmail.com](mailto:chilo0602@hotmail.com), 

### Resumen

El impacto ambiental que genera la agricultura con el uso excesivo de fertilizantes ha provocado la búsqueda de alternativas para mejorar la fertilidad del suelo. El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial de *Lupinus exaltatus* en términos de descomposición y mineralización de Nitrógeno (N) al ser incorporados al suelo como abono verde (AV) y su efecto sobre el crecimiento de plántulas de *Triticum aestivum* L. Se utilizó la técnica de bolsas de descomposición, con un total de 216 bolsas de nailon (10 × 5 cm), en cada bolsa se colocaron 5 g base seca de AV en etapa vegetativa y floración. Posteriormente, las bolsas con AV se colocaron por separado en suelo Vertisol y Regosol a una profundidad de 5 cm; y cada tres semanas hasta finalizar la incubación, se recuperaron tres bolsas por tratamiento. Para evaluar el efecto del AV sobre el crecimiento del *T. aestivum* se estableció un experimento en macetas con suelo Regosol, consistió en incorporar 50 y 34 g base seca del AV (equivalente a 10 y 15 t.ha<sup>-1</sup>). El AV en etapa vegetativa perdió en promedio 83,52 % de su peso inicial, mientras que en floración la pérdida fue del 76,49 %, el N mineralizado fue más alto en suelo Regosol que en Vertisol con 74,02 % y 70,58 %, respectivamente. Las plántulas de trigo presentaron 30 % más de

Recibido: 27-11-2020 • Aceptado: 20-03-2021.

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [chilo0602@hotmail.com](mailto:chilo0602@hotmail.com)

materia seca y N con AV que el tratamiento control. *L. exaltatus* tuvo una rápida descomposición y mineralización de N en las primeras etapas de incubación.

**Palabras clave:** lupino, biomasa, descomposición, liberación de nutrientes, mineralización de N.

### Abstract

The environmental impact generated by agriculture with excessive use of fertilizers has led to the search for alternatives to improve soil fertility. This study aimed to evaluate the potential of *Lupinus exaltatus* in terms of decomposition and mineralization of nitrogen (N) when incorporated into the soil as green manure (GM) and its effect on the growth of *Triticum aestivum* L. seedlings. Litter bags were used, with a total of 216 nylon bags (10 × 5 cm), in each bag were placed 5 g dry base of GM in the vegetative stage and flowering. Subsequently, the GM bags were placed separately Vertisol and Regosol soil at a depth of 5 cm; and every three weeks until the end of the incubation, three bags were recovered per treatment. For evaluation of the effect GM on *T. aestivum* growth experiment was established in pots with soil Regosol, it consisted of incorporating 50 and 34 g dry base of the GM (equivalent to 10 and 15 t.ha<sup>-1</sup>). The GM in the vegetative stage lost an average of 83,52 % of its initial weight, while in flowering the loss was 76,49 %, the mineralized N was higher in Regosol soil than in Vertisol with 74,02 % and 70,58 % respectively. The wheat seedlings presented 30 % more dry matter and N with GM than the control treatment. *L. exaltatus* had a rapid decomposition and mineralization of N in the first stages of incubation.

**Key words:** lupine, biomass, decomposition, nutrient release, N mineralization.

### Resumo

O impacto ambiental gerado pela agricultura com o uso excessivo de fertilizantes levou à busca de alternativas para melhorar a fertilidade do solo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de *Lupinus exaltatus* em termos de decomposição e mineralização do Nitrogênio (N) quando incorporado ao solo como adubo verde (AV) e seu efeito no crescimento de mudas de *Triticum aestivum* L. Foi utilizada a técnica do saco de decomposição, com um total de 216 sacos de náilon (10 × 5 cm), em cada saco foram colocados 5 g de base seca de AV em fase vegetativa e floração. Posteriormente, os sacos com AV foram colocados separadamente com Vertisol e solo de Regosol na profundidade de 5 cm; e a cada três semanas até o final da incubação, três bolsas foram recuperadas por tratamento. Para avaliação do efeito do AV sobre o crescimento do *T. aestivum* foi instalado um experimento em vasos com solo de Regosol, que consistiu na incorporação de 50 e 34 g de base seca do AV (equivalente a 10 e 15 t.ha<sup>-1</sup>). O AV na fase vegetativa perdeu em média 83,52 % do seu peso inicial, enquanto na floração a perda foi de 76,49 %, o N mineralizado foi maior no solo Regosol do que no Vertisol com 74,02 % e 70,58

% respectivamente. As mudas de trigo apresentaram 30 % mais matéria seca e N com AV do que o tratamento controle. *L. exaltatus* tinha uma decomposição rápida e mineralização de N nas primeiras fases de incubação.

**Palabras chave:** tremoço, biomassa, decomposição, liberação de nutrientes, mineralização de N.

## Introducción

La “Fijación Biológica del Nitrógeno” (FBN) es el proceso responsable de la transformación del mayor volumen de N atmosférico ( $N_2$ ) a formas aprovechables por algunas especies de plantas. Esto ocurre mediante la simbiosis entre algunas bacterias del género *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* y raíces de diversas especies de leguminosas (Weisany *et al.*, 2013). Esto cobra importancia en el ciclo de nutrientes, ya que generalmente una gran cantidad de N fijado regresa al suelo mediante la descomposición, después de que estas plantas mueren o cuando son incorporadas al suelo como abono verde (AV) (Giller, 2001). Por lo tanto, las leguminosas son un insumo alternativo e importante como fuente de materia orgánica y N, principalmente en sistemas de producción con enfoque agroecológico, ya que su empleo representa un ahorro económico, sin daños al ambiente y con efectos benéficos sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Shindoi *et al.*, 2012). Bajo condiciones favorables de humedad y temperatura, el AV puede suministrar N inorgánico en forma de amonio ( $NH_4^+$ ) y nitratos ( $NO_3^-$ ) después de su descomposición y mineralización (Celaya-Michel y Castellanos-Villegas, 2011).

## Introduction

The “Biological Nitrogen Fixation” (BNF) is the process responsible for the transformation of the largest volume of atmospheric N ( $N_2$ ) to forms that can be used by some plant species. This occurs through the symbiosis between some bacteria of the genus *Rhizobium* or *Bradyrhizobium* and roots of various species of legumes (Weisany *et al.*, 2013). This becomes important in the nutrient cycle, since generally a large amount of fixed N returns to the soil through decomposition, after these plants die or when they are incorporated into the soil as green manure (AV) (Giller, 2001). Therefore, legumes are an alternative and important input as a source of organic matter and N, mainly in production systems with an agroecological approach, since their use represents an economic saving, without damage to the environment and with beneficial effects on physical properties, chemical and biological of the soil (Shindoi *et al.*, 2012). Under favorable humidity and temperature conditions, AV can supply inorganic N in the form of ammonium ( $NH_4^+$ ) and nitrates ( $NO_3^-$ ) after its decomposition and mineralization (Celaya-Michel and Castellanos-Villegas, 2011).

Some species of the genus *Lupinus* have been studied as AV in different

Algunas especies del género *Lupinus*, han sido estudiadas como AV en diferentes regiones del mundo en términos de producción de biomasa, fijación y contenido de N, así como aspectos relacionados con la velocidad de descomposición y mineralización de N (Zamora-Natera *et al.*, 2019; Perdigão *et al.*, 2017). En otros estudios se ha evaluado directamente el efecto de su incorporación sobre el rendimiento de los cultivos y las propiedades del suelo (Pietrzykowski *et al.*, 2017; Wysokinski *et al.*, 2014; Molina *et al.*, 2011). La mayoría de estos estudios están enfocados principalmente en especies cultivadas como *L. albus*, *L. luteus* y *L. angustifolius* originarias del área del mediterráneo y *L. mutabilis* de origen sudamericano, pero son escasos los estudios encaminados a conocer el potencial que las especies nativas de una determinada región pueden tener como AV. Aunque se estima que en México hay aproximadamente 110 especies silvestres del género *Lupinus* (Bermúdez *et al.*, 2000), se tienen pocos estudios dirigidos a conocer la importancia de estas como AV. Entre estos se encuentran la investigación realizada por Zapata-Hernández *et al.* (2020), Zamora-Natera *et al.* (2019) y Zapata *et al.* (2019), en las que se hace notar el potencial de algunas especies silvestres del género *Lupinus* para producir biomasa con alto contenido de N en condiciones de cultivo. Sin embargo, se considera que es necesario realizar nuevos estudios que nos permitan entender el comportamiento de estas especies después de su incorporación al suelo como AV, en términos de descomposición y mineralización de N. Por lo tanto, el

regions of the world in terms of biomass production, fixation and N content, as well as aspects related to the rate of decomposition and mineralization of N (Zamora-Natera *et al.*, 2019; Perdigão *et al.*, 2017). In other studies, the effect of its incorporation on crop yield and soil properties has been directly evaluated (Pietrzykowski *et al.*, 2017; Wysokinski *et al.*, 2014; Molina *et al.*, 2011). Most of these studies are focused mainly on cultivated species such as *L. albus*, *L. luteus* and *L. angustifolius* originating in the Mediterranean area and *L. mutabilis* of South American origin, but there are few studies aimed at knowing the potential that native species of a certain region can have as AV. Although it is estimated that in Mexico there are approximately 110 wild species of the genus *Lupinus* (Bermúdez *et al.*, 2000), there are few studies aimed at knowing the importance of these as AVs. Among these are the research carried out by Zapata-Hernández *et al.* (2020), Zamora-Natera *et al.* (2019) and Zapata *et al.* (2019), in which the potential of some wild species of the genus *Lupinus* to produce biomass with high N content under cultivation conditions is noted. However, it is considered necessary to carry out new studies that allow us to understand the behavior of these species after their incorporation into the soil as AV, in terms of decomposition and mineralization of N. Therefore, the objective of this research was to evaluate the potential of *L. exaltatus* in terms of decomposition and mineralization of N after its incorporation into the soil as AV, as

objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial de *L. exaltatus* en términos de descomposición y mineralización de N después de su incorporación al suelo como AV, así como su efecto sobre el crecimiento inicial de plántulas de *Triticum aestivum*.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

La especie evaluada (*L. exaltatus*) como AV se cultivó en el campo agrícola experimental del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara, localizado en Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, México. Las coordenadas geográficas son 20°43' N y 103°23' O, con una altitud de 1.600 m.s.n.m., la temperatura media anual es de 20,5 °C con temperaturas máximas y mínimas de 32,1 °C y 8,4 °C, respectivamente (Zapata *et al.*, 2019). La metodología agrícola utilizada fue la descrita por Zamora *et al.* (2019), la densidad de plantas fue de 120.000 plantas.ha<sup>-1</sup>. De los surcos centrales se colectaron al azar 15 plantas en cada etapa fenológica (vegetativa a los 105 días después de la siembra y floración a los 122 días después de la siembra). Se lavaron con agua destilada, se cortaron en secciones menores a 1 cm y se colocaron en una estufa de aire forzado a 70 °C por 48 horas.

### Análisis químico del material vegetal

Se tomó una muestra seca y molida para determinar su composición química inicial (cuadro 1), mientras que el resto se almacenó hasta iniciar el experimento en campo, así como

well as its effect on the initial growth of *Triticum aestivum* seedlings.

## Materials and methods

### Vegetal material

The species evaluated (*L. exaltatus*) as AV was cultivated in the experimental agricultural field of the Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) of the Universidad de Guadalajara, located in Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, Mexico. The geographical coordinates are 20°43'N and 103°23' W, with an altitude of 1,600 meters above sea level, the average annual temperature is 20.5 °C with maximum and minimum temperatures of 32.1 °C and 8.4 °C, respectively (Zapata *et al.*, 2019). The agricultural methodology used was that described by Zamora *et al.* (2019), the density of plants was 120,000 plants.ha<sup>-1</sup>. From the central rows, 15 plants were randomly collected in each phenological stage (vegetative at 105 days after sowing and flowering at 122 days after sowing). They were washed with distilled water, cut into sections smaller than 1 cm and placed in a forced air oven at 70 °C for 48 hours.

### Chemical analysis of plant material

A dry and ground sample was taken to determine its initial chemical composition (table 1), while the rest was stored until starting the field experiment, as well as for the experiment in pots. Lignin Klasón and cellulose were determined by methods D 1106-56 and D 1103-60, respectively

para el experimento en macetas. Se determinó Lignina Klasón y celulosa por los métodos D 1106-56 y D 1103-60, respectivamente (ASTM, 1977). La concentración de C y N se cuantificó por medio de combustión seca en un analizador elemental CHNS-O Leco TruSpec® (LECO, 2010).

(ASTM, 1977). The concentration of C and N was quantified by means of dry combustion in a CHNS-O Leco TruSpec® elemental analyzer (LECO, 2010).

Establishment of the experiment in the field. The decomposition bag method known as “litter-bags” was

### Cuadro 1. Composición química de *Lupinus exaltatus* para evaluar su potencial como abono verde en Zapopan, Jalisco, México.

Table 1. Chemical composition of *Lupinus exaltatus* to evaluate its potential as green manure in Zapopan, Jalisco, Mexico

Etapas fenológicas	Días después de la siembra	Concentración inicial (%)				Relación	
		C	N	Lignina	Celulosa	C:N	Lignina:N
Vegetativa	105	42,4	3,0	19,85	37,69	17,3	6,48
Floración	120	41,9	2,5	23,53	39,07	19,0	9,08

Establecimiento del experimento en campo. Se utilizó el método de las bolsas de descomposición conocido como “litter-bags” (Saria *et al.*, 2018), el cual ha sido ampliamente utilizado para evaluar la descomposición y mineralización de hojarasca, residuos agrícolas y AV (Saria *et al.*, 2018; Shindoi *et al.*, 2012; Villavicencio-Enríquez, 2012). Para el caso de este estudio, se colocaron 5 g de AV (base seca) de *L. exaltatus* en etapa vegetativa y 5 g en etapa de floración por separado, en el interior de bolsas de nylon de 5 cm de ancho x 10 cm de largo y 1 mm de apertura de malla (AMKON® Technology). Se prepararon un total de 216 bolsas, las cuales se enterraron el 01/07/2018 a 5 cm de profundidad del suelo en las regiones agrícolas de Ixtlahuacán de Los Membrillos y en Zapopan del estado de Jalisco, con suelo Vertisol y Regosol, respectivamente, de

used (Saria *et al.*, 2018), which has been widely used to evaluate the decomposition and mineralization of litter, agricultural residues and AV (Saria *et al.*, 2018; Shindoi *et al.*, 2012; Villavicencio-Enríquez, 2012). For this study, 5 g of AV (dry base) of *L. exaltatus* in the vegetative stage and 5 g in the flowering stage were placed separately, inside nylon bags 5 cm wide x 10 cm thick. long and 1 mm mesh opening (AMKON® Technology). A total of 216 bags were prepared, which were buried on 07/01/2018 at a depth of 5 cm from the soil in the agricultural regions of Ixtlahuacán de Los Membrillos and in Zapopan of the state of Jalisco, with Vertisol and Regosol soil, respectively, according to the FAO classification (WRB, 2015). Table 2 shows the initial characteristics of the soils where the

acuerdo a la tipificación de la FAO (WRB, 2015). En el cuadro 2 se muestran las características iniciales de los suelos donde se llevó a cabo el experimento de incubación, las determinaciones se realizaron de acuerdo a la NOM 021 REC/NAT (2000).

incubation experiment was carried out, the determinations were made according to NOM 021 REC/NAT (2000).

A random blocks experimental design was used with a factorial arrangement of 2 x 2 x 6 three factors

**Cuadro 2. Características físicas y químicas de los suelos tipificados Vertisol y Regosol, en las regiones agrícolas de Ixtlahuacán de Los Membrillos y Zapopan, Jalisco, México, para la evaluación en campo de *Lupinus exaltatus* como abono verde.**

**Table 2. Physical and chemical characteristics of the Vertisol and Regosol typified soils, in the agricultural regions of Ixtlahuacán de Los Membrillos and Zapopan, Jalisco, Mexico, for the field evaluation of *Lupinus exaltatus* as green manure.**

Determinación	Zapopan (Regosol)	Ixtlahuacán (Vertisol)
Textura	Franco arenoso	Arcillo limoso
Arcilla	9,71	41,30
Limo	20,20	49,60
Arena	70,10	9,07
pH	5,90	6,37
Relación C:N	11,50	11,00
Materia Orgánica	1,55	2,10
N (%)	0,09	0,12
P mg.kg <sup>-1</sup>	23,80	17,30
K cmol.kg <sup>-1</sup>	0,82	0,71
Ca cmol.kg <sup>-1</sup>	5,00	12,60
Mg cmol.kg <sup>-1</sup>	0,42	3,84
Na cmol.kg <sup>-1</sup>	0,12	0,30

N: nitrógeno, P: fósforo, K: potasio, Ca: calcio, Mg: magnesio, Na: sodio. Fuente: Laboratorio de suelos, CUCBA, Universidad de Guadalajara.

N: nitrogen, P: phosphorus, K: potassium, Ca: calcium, Mg: magnesium, Na: sodium. Source: Soil Laboratory, CUCBA, University of Guadalajara

Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar con arreglo factorial de 2 x 2 x 6 tres factores (suelo, etapa fenológica y periodo de incubación) con un total tres repeticiones por

(soil, phenological stage and incubation period) with a total of three repetitions per treatment. The average temperature and precipitation that occurred during the study time is shown in table 3.



tratamiento. La temperatura y la precipitación promedio que se presentó durante el tiempo del estudio se muestra en el cuadro 3.

**Remaining material and N analysis.** Once the bags with VA were incorporated into the soil and after three weeks, three bags were removed

**Cuadro 3. Precipitación y temperatura promedio en las regiones agrícolas de Ixtlahuacán de Los Membrillos y Zapopan, Jalisco, México, para la evaluación en campo de *Lupinus exaltatus* como abono verde.**

**Table 3. Precipitation and average temperature in the agricultural regions of Ixtlahuacán de Los Membrillos and Zapopan, Jalisco, Mexico, for the field evaluation of *Lupinus exaltatus* as green manure.**

Tiempo (Meses)	Ixtlahuacán		Zapopan	
	Precipitación (mm)	Temperatura (° C)	Precipitación (mm)	Temperatura (° C)
Julio	236	21,5	290	22,00
Agosto	245	21,0	206	21,52
Septiembre	149	20,3	158	21,04
Octubre	45	19,1	70	20,00

Fuente: SMN-CONAGUA (2018).

Source: SMN-CONAGUA (2018).

Material remanente y análisis de N. Una vez incorporadas las bolsas con AV al suelo y transcurridas tres semanas, se retiraron tres bolsas por tratamiento por cada suelo durante un periodo de 18 semanas. Las bolsas de AV se trasladaron al laboratorio de Biotecnología del Departamento de Botánica y Zoología (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara, donde se limpiaron de restos de suelo y pequeñas raíces. Se recuperó el material vegetal remanente, el cual posteriormente se colocó en el interior de una estufa de aire forzado a 70 °C durante 48 horas (Martínez *et al.*, 1989). Se estimó el peso seco del material vegetal remanente y se tomó una muestra para la determinación

per treatment for each soil during a period of 18 weeks. The AV bags were transferred to the Biotechnology Laboratory of the Departamento de Botánica y Zoología (CUCBA) of the Universidad de Guadalajara, where they were cleaned of soil debris and small roots. The remaining plant material was recovered, which was subsequently placed inside a forced air oven at 70 °C for 48 hours (Martínez *et al.*, 1989). The dry weight of the remaining plant material was estimated and a sample was taken for the determination of N by the Kjeldahl method (Bremner, 1996). To determine the decomposition and mineralization of N in the AV, the dry weight and remaining N were

de N mediante el método Kjeldahl (Bremner, 1996). Para determinar la descomposición y mineralización de N del AV se calculó, para todos los periodos de muestreo, el peso seco y N remanente expresado en porcentaje como lo muestra la siguiente fórmula:

$$(\%) \text{XR} = (X_t / X_0) \times 100$$

Donde (%) XR es el porcentaje de peso seco remanente o N remanente,  $X_t$ , es el peso seco o contenido de N en cada tiempo de muestreo y  $X_0$  el peso inicial y N inicial del AV.

Establecimiento del experimento en macetas. El 20/11/2019 se estableció una evaluación a corto plazo (30 días) en macetas para evaluar el efecto de *L. exaltatus* como AV sobre el crecimiento de plántulas de trigo (*T. aestivum*), bajo condiciones de riego (cada tres días) y temperatura ambiente (20 °C promedio) en el área de viveros del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (Universidad de Guadalajara). Se utilizó el suelo Regosol recolectado de campos agrícolas sembrados con maíz (*Zea mays*), en la región de Nextipac Zapopan, Jalisco, cuyas propiedades físicas y químicas se muestran en el cuadro 2. La cantidad de AV aplicada fue de 50 y 34 g (equivalente a 15 y 10 t.ha<sup>-1</sup>, respectivamente), también se utilizó urea para la fertilización química en una dosis de 1,6 g.maceta<sup>-1</sup> (equivalente a 200 kg N.ha<sup>-1</sup>). Los tratamientos se conformaron de la siguiente manera: T1 = 50 g de AV incorporado al suelo en etapa vegetativa; T2 = 34 g de AV incorporado al suelo en etapa vegetativa; T3 = 50 g de AV incorporado al suelo en etapa de floración; T4 = 34 g de AV incorporado al suelo en etapa de floración; T5 = suelo

calculated for all sampling periods, expressed as a percentage as shown by the following formula:

$$(\%) \text{XR} = (X_t / X_0) \times 100$$

Where (%) XR is the percentage of dry weight remaining or N remaining,  $X_t$ , is the dry weight or N content at each sampling time and  $X_0$  the initial weight and initial N of the VA.

**Establishment of the experiment in pots.** On 11/20/2019 a short-term evaluation (30 days) was established in pots to evaluate the effect of *L. exaltatus* as AV on the growth of wheat (*T. aestivum*) seedlings, under irrigation conditions (every three days) and ambient temperature (20 °C average) in the nursery area of the Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (Universidad de Guadalajara). Regosol soil collected from agricultural fields planted with corn (*Zea mays*) was used, in the Nextipac Zapopan region, Jalisco, whose physical and chemical properties are shown in table 2. The amount of AV applied was 50 and 34 g (equivalent to 15 and 10 t.ha<sup>-1</sup>, respectively), urea was also used for chemical fertilization in a dose of 1.6 g.pot<sup>-1</sup> (equivalent to 200 kg N.ha<sup>-1</sup>). The treatments were made as follows: T1 = 50 g of AV incorporated into the soil in the vegetative stage; T2 = 34 g of VA incorporated into the soil in the vegetative stage; T3 = 50 g of AV incorporated into the soil in the flowering stage; T4 = 34 g of VA incorporated into the soil in the flowering stage; T5 = soil with chemical fertilization (urea: 46-00-00) and T6 = soil without AV and without fertilizer (control). One week after the

con fertilización química (urea: 46-00-00) y T6 = suelo sin AV y sin fertilizante (control). Una semana después de la incorporación del AV (27/11/2019) se sembraron 20 semillas de trigo variedad Cortázar S94 en las macetas a las cuales previamente se les colocó 7,5 kg de suelo y se fertilizaron seis días después de la siembra. El diseño experimental consistió en un completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. Las variables evaluadas fueron: rendimiento de la biomasa aérea, concentración de N (%) mediante el método Kjeldahl (Bremner, 1996) y rendimiento de N total en dicha biomasa.

**Análisis estadístico.** Las variables porcentaje de descomposición y N mineralizado del experimento en campo, así como rendimiento de biomasa, concentración de N (%) y N total en la biomasa de trigo cosechada en el experimento en macetas, fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de promedios mediante la prueba Tukey (0,05), se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurión XVII (Statgraphics, 2014).

## Resultados y discusión

**Evaluación de campo.** El material vegetal recuperado o remanente disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) en ambos tipos de suelos conforme se incrementó el periodo de incubación independientemente de la etapa fenológica en la que se evaluó. La descomposición del material vegetativo en términos de un incremento en los porcentajes de pérdida de peso se muestra en la figura 1. Durante las primeras tres

incorporación de the VA (11/27/2019), 20 seeds of wheat variety Cortázar S94 were sown in the pots to which 7.5 kg of soil were previously placed and fertilized six days after sowing. The experimental design consisted of a completely randomized with three repetitions per treatment. The variables evaluated were: aerial biomass yield, N concentration (%) by the Kjeldahl method (Bremner, 1996) and total N yield in biomass.

**Statistical analysis.** The variables percentage of decomposition and mineralized N of the field experiment, as well as biomass yield, concentration of N (%) and total N in the wheat biomass harvested in the experiment in pots, were subjected to an analysis of variance and comparison of averages using the Tukey test (0.05), the statistical program Statgraphics Centurión XVII (Statgraphics, 2014) was used.

## Results and discussion

**Field evaluation.** The recovered or remaining plant material decreased significantly ( $p < 0.05$ ) in both types of soils as the incubation period increased regardless of the phenological stage in which it was evaluated. The decomposition of the vegetative material in terms of an increase in the percentages of weight loss is shown in figure 1. During the first three weeks the weight loss of the AV in the Vertisol soil was 63.4 % in the vegetative stage and 54.94 % in the flowering stage, while in Regosol soil these values were 67.6 and 58.4 %, respectively. At the end of the

semanas la pérdida de peso del AV en el suelo Vertisol fue del 63,4 % en etapa vegetativa y de 54,94 % en la etapa de floración, mientras que en el suelo Regosol estos valores fueron del 67,6 y 58,4 %, respectivamente. Al finalizar los muestreos las pérdidas de peso del AV en el suelo Regosol variaron de 78,93 % en la etapa de floración hasta 84,02 % en la etapa vegetativa. Un comportamiento similar, pero con valores diferentes de pérdida de peso se registraron en el suelo Vertisol de 73,89 % en etapa de floración hasta 82,27 % en etapa vegetativa. En el suelo Vertisol se observó que la pérdida de peso en etapa vegetativa fue significativamente mayor que en etapa de floración. En el suelo Regosol este comportamiento no se pudo mantener hasta el final del experimento, porque después del cuarto muestreo no hubo diferencias significativas, aunque los porcentajes de pérdida de peso fueron ligeramente superiores en etapa vegetativa que en etapa de floración.

La rápida descomposición del AV en términos de pérdida de biomasa en las primeras semanas de incubación, así como una pérdida de peso lenta y gradual hasta el final del periodo de incubación es consistente con lo reportado por Thönnissen *et al.* (2000), los cuales mencionan pérdidas de peso del 30 al 70 % en *Glycyne max* e *Indigofera tinctoria* después de cinco semanas de incubación. En Brasil las especies *Arachis pintoi*, *Calopogonium muconoides*, *Stizilobium aterrimum* y *Stylosantes guianensis* fueron evaluadas como AV en plantaciones de café y se reportaron valores de pérdida

de peso del AV en el suelo Regosol en las etapas de floración y vegetativa. Similar behavior, but with different weight loss values, was recorded in Vertisol soil from 73.89 % in the flowering stage to 82.27 % in the vegetative stage. In the Vertisol soil, it was observed that the weight loss in the vegetative stage was significantly greater than in the flowering stage. In Regosol soil, this behavior could not be maintained until the end of the experiment, because after the fourth sampling there were no significant differences, although the percentages of weight loss were slightly higher in the vegetative stage than in the flowering stage.

The rapid decomposition of VA in terms of biomass loss in the first weeks of incubation, as well as a slow and gradual weight loss until the end of the incubation period is consistent with that reported by Thönnissen *et al.* (2000), who mention weight losses of 30 to 70 % in *Glycyne max* and *Indigofera tinctoria* after five weeks of incubation. In Brazil, the species *Arachis pintoi*, *Calopogonium muconoides*, *Stizilobium aterrimum* and *Stylosdamientos guianensis* were evaluated as VA in coffee plantations and biomass loss values of 30 to 60 % were reported in the first 30 days (Matos *et al.*, 2011). In Korea, the incorporation of *Vicia villosa* in soils dedicated to rice cultivation showed biomass loss values of 72-81 % at 30 days of incubation (Lee *et al.*, 2002).

The mineralization in terms of the percentage of N released from the VA during the incubation period showed,

de biomasa del 30 al 60 % en los primeros 30 días (Matos *et al.*, 2011). En Corea, la incorporación de *Vicia villosa* en suelos dedicados al cultivo de arroz mostró valores de pérdida de biomasa de 72-81 % a los 30 días de incubación (Lee *et al.*, 2002).

in both soils, a similar trend to the decomposition process, with a rapid release of N in the first three weeks of exposure to the soil (figure 2). Although a general trend was observed to continue releasing N throughout the incubation period, between weeks

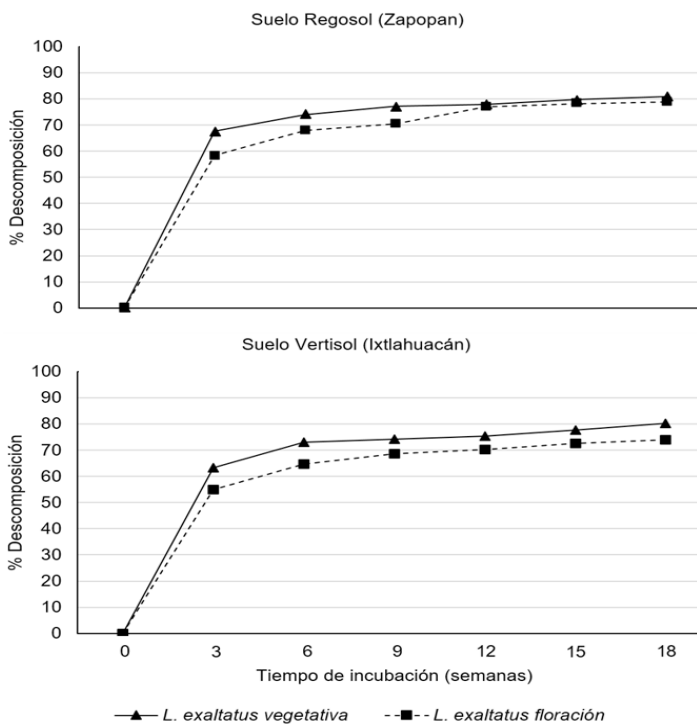


Figura 1. Dinámica de descomposición de *Lupinus exaltatus* utilizado como abono verde, en las regiones agrícolas de Ixtlahuacán de Los Membrillos y Zapopan, Jalisco, México.

Figure 1. Decomposition dynamics of *Lupinus exaltatus* used as green manure, in the agricultural regions of Ixtlahuacán de Los Membrillos and Zapopan, Jalisco, Mexico.

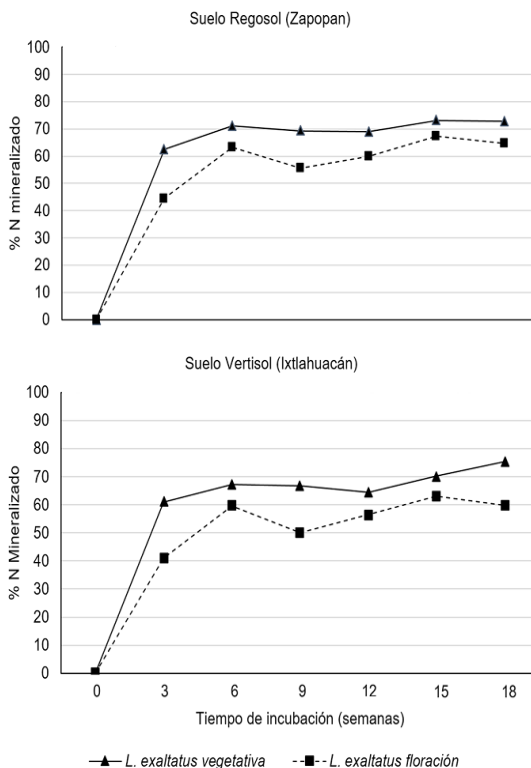
La mineralización en términos de porcentaje de N liberado del AV durante el periodo de incubación mostró, en ambos suelos, una tendencia similar al proceso de descomposición, con una rápida liberación de N en las primeras tres semanas de exposición al suelo (figura 2). Aunque se observó una tendencia general a continuar liberando N a lo largo del periodo de incubación, entre las semanas 6 y 12 se presentó un evento temporal de inmovilización de N, seguido posteriormente de un proceso lento de mineralización. En ambos suelos y en prácticamente todos los muestreos se hizo notar que el mayor porcentaje de N liberado del AV incorporado en la etapa más joven (vegetativa) es significativamente mayor al incorporado en la etapa de mayor edad (floración).

Como resultado de la rápida liberación de N en las primeras tres semanas de incubación en el suelo Vertisol, el porcentaje de mineralización fue de 61,02 % en etapa vegetativa y de 40,98 % en etapa de floración, mientras que en el suelo Regosol la liberación de N fue de 62,61 % en etapa vegetativa y de 44,59 % en etapa de floración. Por otro lado, e independientemente de la etapa fenológica en la que fue incorporado el AV los porcentajes promedio de N liberado durante seis muestreos (18 semanas) fueron estadísticamente más altos en el suelo Regosol que en el suelo Vertisol con 74,02 % y 70,58 %, respectivamente (figura 2).

6 and 12 a temporary event of N immobilization occurred, followed later by a slow mineralization process. In both soils and in practically all the samplings, it was noted that the highest percentage of N released from the AV incorporated in the youngest stage (vegetative) is significantly higher than that incorporated in the oldest stage (flowering).

As a result of the rapid release of N in the first three weeks of incubation in the Vertisol soil, the mineralization percentage was 61.02 % in the vegetative stage and 40.98 % in the flowering stage, while in the Regosol soil the release of N was 62.61 % in the vegetative stage and 44.59 % in the flowering stage. On the other hand, and regardless of the phenological stage in which the VA was incorporated, the average percentages of N released during six samplings (18 weeks) were statistically higher in the Regosol soil than in the Vertisol soil with 74.02 % and 70, 58 %, respectively (figure 2).

The high percentages of N released during the first weeks after having incorporated the VA, coincide with the results obtained by Cobo *et al.* (2002), who reported N release values of 40 to 60 % in different legumes in an incubation period of two weeks. In another study Cobo *et al.* (2008), obtained N release percentages of 72 % in *Indigofera constricta* and 63 % in *Mucuna pruriens* at four weeks of incubation. Another investigation of Matos *et al.* (2011), in four weeks of evaluation in Brazil, reported values of 67 to 78 % in *Arachis pintoi*, *Calopogonium muconoides*, *Stylosanthes guianensis* and *Stizolobium aterrimum*.



**Figura 2. Porcentaje de N mineralizado de *Lupinus exaltatus* utilizado como abono verde en las regiones agrícolas de Ixtlahuacán de Los Membrillos y Zapopan, Jalisco, México.**

**Figure 2. Percentage of mineralized N from *Lupinus exaltatus* used as green manure in the agricultural regions of Ixtlahuacán de Los Membrillos and Zapopan, Jalisco, Mexico.**

Los altos porcentajes de N liberado durante las primeras semanas de haber incorporado el AV, coincide con los resultados obtenidos por Cobo *et al.* (2002), quienes reportaron valores de liberación de N del 40 al 60 % en diferentes leguminosas en un periodo

In this study, the rapid decomposition and mineralization of N in the VA may be associated with two factors; the first is probably related to time in which the experiment was established, since the incubation period of the VA in the soil

de incubación de dos semanas. En otro estudio Cobo *et al.* (2008), obtuvieron porcentajes de liberación de N de 72 % en *Indigofera constricta* y 63 % en *Mucuna pruriens* a cuatro semanas de incubación. Por su parte Matos *et al.* (2011), en cuatro semanas de evaluación en Brasil reportaron valores del 67 al 78 % en *Arachis pintoi*, *Calopogonium muconoides*, *Stylosanthes guianensis* y *Stizolobium aterrimum*.

En el presente estudio, la rápida descomposición y mineralización de N en el AV puede estar asociado a dos factores; el primero tiene relación probablemente con el tiempo en el que se estableció el experimento, ya que el periodo de incubación del AV en el suelo coincidió con la época de mayor precipitación en el estado de Jalisco (cuadro 3). Lo anterior permitió mantener niveles óptimos de humedad en el suelo para favorecer la actividad de los microorganismos descomponedores (bacterias y hongos) y la rápida liberación de compuestos hidrosolubles como algunos compuestos nitrogenados y carbohidratos no estructurales (Nevins *et al.*, 2018; Zapata-Hernández *et al.*, 2020). Al respecto se ha reportado que las condiciones edafoclimáticas como temperatura y humedad son buenos predictores de la descomposición y mineralización de N (Shindo *et al.*, 2012). Por otro lado, es posible que la composición química inicial del AV, independientemente de la etapa fenológica, fue otro factor que favoreció la rápida descomposición y mineralización de N, generalmente materiales con baja relación C:N y bajo contenido de lignina (típico de muchas leguminosas) tienden

coincided with the time of greatest rainfall in the state of Jalisco (Table 3). This made it possible to maintain optimal levels of humidity in the soil to favor the activity of decomposing microorganisms (bacteria and fungi) and the rapid release of water-soluble compounds such as some nitrogenous compounds and non-structural carbohydrates (Nevins *et al.*, 2018; Zapata-Hernández *et al.*, 2020). In this regard, it has been reported that edaphoclimatic conditions such as temperature and humidity are good predictors of the decomposition and mineralization of N (Shindo *et al.*, 2012). On the other hand, it is possible that the initial chemical composition of the VA, regardless of the phenological stage, was another factor that favored the rapid decomposition and mineralization of N, generally materials with a low C:N ratio and low lignin content (typical of many legumes) tend to decompose and mineralize faster than some organic substrates with high levels (Brunetto *et al.*, 2011), therefore, high N contents in the C:N ratio and lignin limit the growth of decomposing microorganisms, for which is common the presence of recalcitrant compounds whose molecules present bonds more resistant to the degradation of organic materials (Brunetto *et al.*, 2011; Odhiambo, 2010). In this regard, Thönnissen *et al.* (2000) mentioned that the weight loss pattern is consistent with previous assumptions that residues contain labile and recalcitrant fractions, which have different degrees of resistance to degradation microbial action. In this



a descomponerse y mineralizarse más rápido que algunos sustratos orgánicos con niveles altos (Brunetto *et al.*, 2011), por lo tanto, altos contenidos de N en la relación C:N y lignina limitan el crecimiento de los microorganismos descomponedores, por lo cual es común la presencia de compuestos recalcitrantes cuyas moléculas presentan enlaces más resistentes a la degradación de los materiales orgánicos (Brunetto *et al.*, 2011; Odhiambo, 2010). Al respecto, Thönnissen *et al.* (2000) mencionaron que el patrón de pérdida de peso concuerda con las suposiciones previas de que los residuos contienen fracciones lábiles y recalcitrantes, los cuales tienen diferentes grados de resistencia a la degradación microbiana. En este sentido la rápida descomposición del AV de los 0 a los 18 días puede ser explicado en función a lo reportado por Cotrufo *et al.* (2013), quienes señalaron que los microorganismos descomponedores actúan rápidamente sobre los azúcares de fácil degradación, no así en otros componentes como la celulosa, la lignina y los polifenoles. Aunque son pocos los estudios encaminados a evaluar la descomposición y mineralización de AV a diferentes edades o etapas fenológicas, según los resultados del presente estudio se considera que la tendencia a encontrar mayores pérdidas de biomasa en el AV incorporado en la etapa de menor desarrollo (vegetativa) en comparación con la etapa de mayor desarrollo (floración) puede ser explicada en términos de diferencias en la composición química, calidad y cantidad del AV (Shahbaz *et al.*, 2017).

Por otro lado, se ha reportado que valores altos de lignina pueden

sense, the rapid decomposition of VA from 0 to 18 days can be explained based on what was reported by Cotrufo *et al.* (2013), who pointed out that decomposing microorganisms act quickly on easily degradable sugars, not on other components such as cellulose, lignin and polyphenols. Although there are few studies aimed at evaluating the decomposition and mineralization of VA at different ages or phenological stages, according to the results of the present study, it is considered that the tendency to find greater biomass losses in the VA incorporated in the lower development stage (vegetative) compared to the stage of greatest development (flowering) can be explained in terms of differences in the chemical composition, quality and quantity of the VA (Shahbaz *et al.*, 2017).

On the other hand, it has been reported that high lignin values can prevent decomposition because this compound functions as a physical barrier that protects cellulose and other components of the cell wall from attack by microorganisms (Cotrufo *et al.*, 2013). It has also been documented that certain soil properties (texture, pH, organic matter, microbial activity, salinity, humidity and nutrient availability) have a high relationship with the decomposition and mineralization of N (Monsalve *et al.*, 2017). Although in this study at the end of the experiment the percentages of biomass loss and N released showed little differences in both soils, in the first stages of evaluation the Regosol soil registered a higher percentage of biomass loss and N mineralization

impedir la descomposición debido a que este compuesto funciona como una barrera física que protege a la celulosa y a otros componentes de la pared celular del ataque de los microorganismos (Cotrufó *et al.*, 2013). También se ha documentado que ciertas propiedades del suelo (textura, pH, materia orgánica, actividad microbiana, salinidad, humedad y disponibilidad de nutrientes) tienen una alta relación con la descomposición y mineralización de N (Monsalve *et al.*, 2017). Aunque en este estudio al final del experimento los porcentajes de pérdida de biomasa y N liberado mostraron escasas diferencias en ambos suelos, en las primeras etapas de evaluación el suelo Regosol registró un mayor porcentaje de pérdida de biomasa y mineralización de N en comparación al suelo Vertisol (figura 1 y 2). Lo anterior puede estar relacionado principalmente a la diferencia de textura que existe entre los dos suelos, presentando el suelo Vertisol porcentajes más altos de arcilla y limo en comparación con el suelo Regosol (cuadro 2). Esto tiene sentido con lo reportado por Castellano *et al.* (2012), donde mencionan que la mineralización es más baja en suelos con texturas finas debido a la capacidad que presentan las arcillas de proteger la materia orgánica contra la descomposición.

**Evaluación en macetas.** El análisis de varianza de las variables evaluadas en las plántulas de trigo mostró diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ). El cuadro 4 muestra la comparación de promedios entre tratamientos para cada variable

comparado to Vertisol soil (figures 1 and 2). This may be mainly related to the difference in texture that exists between the two soils, with the Vertisol soil presenting higher percentages of clay and silt compared to the Regosol soil (table 2). This makes sense with what is reported by Castellano *et al.* (2012), where they mention that mineralization is lower in soils with fine textures due to the ability of clays to protect organic matter against decomposition.

**Evaluation in pots.** The analysis of variance of the variables evaluated in the wheat seedlings showed significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ). Table 4 shows the comparison of means between treatments for each variable under study. The total harvested wheat biomass ranged from 4.82 g.pot<sup>-1</sup> in T6 (control) to 8.26 g.pot<sup>-1</sup> in T1 (50 g of VA in vegetative stage). The highest percentage of N was found in the wheat biomass that received chemical fertilization (3.98 %), while the biomass harvested in T6 (control) was the one that showed the lowest concentration of N (1.89 %). Regarding the aforementioned, Morales *et al.* (2019), comment that urea as a fertilizer has the advantage of providing a high content of N (46 %) which can be used quickly, but also presents volatilization losses in the form of ammonia gas and leaching.

The higher biomass production and N content in wheat seedlings harvested from T1 (50 g of AV in vegetative stage) compared to treatments T2, T3, T4 and T6 can be explained in terms of a rapid release and availability of N for wheat

en estudio. La biomasa total de trigo cosechada varió de 4,82 g.maceta<sup>-1</sup> en el T6 (control) hasta 8,26 g.maceta<sup>-1</sup> en el T1 (50 g de AV en etapa vegetativa). El mayor porcentaje de N se encontró en la biomasa de trigo que recibió fertilización química (3,98 %), mientras que la biomasa cosechada en el T6 (control) fue la que mostró la menor concentración de N (1,89 %). Con respecto a lo antes mencionado, Morales *et al.* (2019), comentan que la urea como fertilizante presenta la ventaja de proporcionar un alto contenido de N (46 %) el cual puede ser utilizado de forma rápida, pero también presenta pérdidas por volatilización en forma de gas amoníaco y lixiviación.

seedlings, in addition to the quality and quantity of the VA (Shahbaz *et al.*, 2017), which is related to the decomposition and mineralization results of N obtained in the field experiment.

In other *Lupinus* species used as VA, the effects of the rapid release and availability of N for other plant species of agricultural importance have also been documented (Tighe-Neira *et al.*, 2015). However, it is considered necessary to carry out another long-term study in order to know if the amount of N released from the VA of *L. exaltatus* is sufficient to cover the internal demand for N in wheat plants during their growth and grain production.

#### Cuadro 4. Efecto del abono verde de *Lupinus exaltatus* sobre el crecimiento inicial de plántulas de trigo.

#### Cuadro 4. Efecto del abono verde de *Lupinus exaltatus* sobre el crecimiento inicial de plántulas de trigo.

Tratamientos	Biomasa total (g.maceta <sup>-1</sup> )	N (%)	N total en biomasa (mg.maceta <sup>-1</sup> )
1=50 g de AV en etapa vegetativa	8,26 a	2,63 b	217,23 a
2=34 g de AV en etapa vegetativa	7,25 b	2,33 b	168,92 b
3=50 g de AV en etapa de floración	6,01 c	2,37 b	142,42 c
4=34 g de AV en etapa de floración	5,49 c	2,13 c	116,90 c
5= 1,6 g (urea) fertilizante químico	5,62 c	3,98 a	223,62 a
6= Suelo sin abono y sin fertilizante	4,82 d	1,89 c	91,09 d

Promedios con la misma letra en las columnas no presentan diferencias significativas ( $p>0,05$ ). AV: abono verde.

Averages with the same letter in the columns do not present significant differences ( $p>0,05$ ). AV: green manure.

La mayor producción de biomasa y contenido de N en las plántulas de trigo cosechadas del T1 (50 g de AV en etapa vegetativa) en comparación a los

#### Conclusions

*L. exaltatus* showed potential as AV with a rapid decomposition and

tratamientos T2, T3, T4 y T6 puede ser explicado en términos de una rápida liberación y disponibilidad de N para las plántulas de trigo, además de la calidad y cantidad del AV (Shahbaz *et al.*, 2017), lo cual tiene relación con los resultados de descomposición y mineralización de N obtenidos en el experimento de campo.

En otras especies de *Lupinus* utilizadas como AV, también se han documentado los efectos de la rápida liberación y disponibilidad de N para otras especies vegetales de importancia agrícola (Tighe-Neira *et al.*, 2015). Sin embargo, se considera necesario realizar otro estudio a largo plazo con el propósito de conocer si la cantidad de N liberado del AV de *L. exaltatus* es suficiente para cubrir la demanda interna de N en las plantas de trigo durante su crecimiento y producción de grano.

## Conclusiones

*L. exaltatus* mostró potencial como AV con una rápida descomposición y mineralización de N, donde influyeron factores como la composición química, la etapa fenológica y el tipo de suelo. En las primeras etapas de incubación se observó una tendencia a encontrar mayor descomposición y liberación de N en el AV incorporado en la etapa vegetativa que en la etapa de floración. Así mismo, la descomposición y mineralización tienden a ser más lentas en el suelo Vertisol que en el Regosol.

El N liberado del AV mostró un efecto favorable sobre el crecimiento inicial de las plántulas de trigo, sin embargo, la urea por su rápida absorción, fue la que mayor eficacia presentó en porcentaje de N y contenido de N en biomasa.

mineralization of N, where factors such as chemical composition, phenological stage and soil type influenced. In the first stages of incubation, a tendency was observed to find greater decomposition and release of N in the AV incorporated in the vegetative stage than in the flowering stage. Likewise, decomposition and mineralization tend to be slower in Vertisol soil than in Regosol.

The N released from the AV showed a favorable effect on the initial growth of wheat seedlings, however, urea, due to its rapid absorption, was the one that presented the highest efficiency in percentage of N and content of N in biomass.

---



---

## End of English Version

---



---

## Literatura citada

- American Society for Testing and Materials (ASTM). 1977. Annual book of ASTM standards. Part 22: wood; adhesives. West Conshohocken, PA, USA. p. 343-345.
- Base referencial mundial del recurso suelo (WRB) IUSS Working Group. 2015. Sistema internacional de clasificación de suelos para la nomenclatura de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. Informes sobre recursos mundiales de suelos. No. 106. Tercera Edición. FAO. Viale delle Terme di Caracalla, Roma, Italia. 218 p. Disponible en: <https://www.iec.cat/mapasols/DocuInteres/PDF/Libre59.pdf>
- Bermúdez, T. K., Q. N. Robledo, H. J. Martínez, T. Andreas and M. Wink. 2000. Biodiversity of the genus *Lupinus* in Mexico. In: Van Santen, E., M. Wink, S. Weissmann y P. Römer (eds). Proceedings 9th International Lupin Conference. International Lupin Association. Klink/Müriz, Germany. p. 294-296.

- Bremner, J. M. 1996. Nitrogen-total. In: Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods. (Ed. Sparks DL), p. 1085-1121. SSSA Book Series 5. Soil Science Society of America, Madison, WI. EEUU.
- Brunetto, G., M. Ventura, F. Scandellari, C. A. Ceretta, J. Kaminski, G. W. de Melo and M. Tagliavini. 2011. Nutrient release during the decomposition of mowed perennial ryegrass and white clover and its contribution to nitrogen nutrition of grapevine. *Nutr. Cycling. Agroecosyst.* 90(3):299-308.
- Castellano, M. J., J. P. Kaye, H. Lin and J. P. Schmidt. 2012. Linking carbon saturation concepts to nitrogen saturation and retention. *Ecosyst.* 15(2):175-187.
- Celaya-Michel, H. y A. Castellanos-Villegas. 2011. Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *Terra Latinoam.* 29:343-356.
- Cobo, J., E. Barrios and R. Delve. 2008. Decomposition and nutrient release from intra-specific mixtures of legume plant materials. *Comm. Soil. Sci. Plant. Anal.* 39 (3-4):616-625.
- Cobo, J., E. Barrios, D. C. Kass and R. Thomas. 2002. Nitrogen mineralization and crop uptake from surface-applied leaves of green manure species on a tropical volcanic-ash soil. *Biol. Fertil. Soils.* 36(2):87-92.
- Cotrufo, M. F., M. D. Wallenstein, C. M. Boot, K. Deneff and E. Paul. 2013. The Microbial Efficiency-Matrix Stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: do labile plant inputs form stable soil organic matter?. *Glob Chang Biol.* 19(4):988-995.
- Giller, K. E. 2001. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. Second edition. CABI Publishing. Wallingford, UK. 448 p.
- LECO. 2010. Organic application notes. Available in: [http://www.leco.co.za/wpcontent/uploads/2012/02/CHN2000\\_PLANT\\_TISSUE\\_203-821160.pdf](http://www.leco.co.za/wpcontent/uploads/2012/02/CHN2000_PLANT_TISSUE_203-821160.pdf)
- Lee, J. S., H. J. Lee and J. H. Seo. 2002. Decomposition and N release of hairy vetch applied as a green manure and its effects on rice yield in paddy field. *Korean J. Crop. Sci.* 47(2):137-141.
- Martínez, J., F. Ojeda, I. Yepes y I. Jácome, 1989. Formas de secado en la determinación de la materia seca en el *Pennisetum purpureum* cv. Taiwan A-144. *Past. y Forr.* 12(1):59-64.
- Matos, E. D. S., E. D. S. Mendonça, I. M. Cardoso, P. C. D. Lima and D. Freese. 2011. Decomposition and nutrient release of leguminous plants in coffee agroforestry systems. *Rev. Bras. Cienc. Solo.* 35(1):141-149.
- Molina, Y., A. Mora, M. Ramos y L. Parra. 2011. Evaluación de dos especies leguminosas como abono verde. Cuenca alta del Río Chama, Mérida, Venezuela. *Rev. Forest. Venez.* 55(2):183-193.
- Monsalve, C. O. I., D. J. S. Gutiérrez y W. A. Cardona. 2017. Factores que intervienen en el proceso de mineralización de nitrógeno cuando son aplicadas enmiendas orgánicas al suelo. Una revisión. *Rev. Colomb. Cienc. Hortic.* 11(1):200-209.
- Morales, E. J. M., M. R. Arriaga, J. A. L. Sandoval, A. R. M. Campos y E. J. M. Rosales. 2019. Urea (NBPT) una alternativa en la fertilización nitrogenada de cultivos anuales. *Rev. Mexicana Cienc. Agric.* 10(8):1875-1886.
- Nevens, C. J., C. Nakatsu and S. Armstrong. 2018. Characterization of microbial community response to cover crop residues. *Soil. Biol. Biochem.* 123:39-49.
- NOM-021-REC/NAT-2000 (Norma Oficial Mexicana). 2002. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. SEMARNAT. México, D. F. 85 p.
- Odhiambo, J. J. 2010. Decomposition and nitrogen release by green manure legume residues in different soil types. *Afr. J. Agric. Res.* 5(1):90-96.
- Perdigão, A., J. Pereira, N. Moreira, H. Trindade and J. Coutinho. 2017.




- Carbon and nitrogen mineralisation from green manures as alternative nitrogen sources in Mediterranean farming. Arch. Agron. Soil. Sci. 63(11):1546-1555.
- Pietrzykowski, M., P. Gruba and G. Sproull. 2017. The effectiveness of Yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) green manure cropping in sand mine cast reclamation. Ecol. Eng. 102:72-79.
- Saria, A. G., K. P. Sibuga, E. Semu and H. Høgh-Jensen. 2018. Soil Fertility Dynamics of Ultisol as Influenced by Greengram and Mucuna Green Manures. J. Plant. Sci. Agri. Res. 2:1-14.
- Shahbaz, M., Y. Kuzyakov, M. Sanaullah, F. Heitkamp, V. Zelenev, A. Kumar and E. Blagodatskaya. 2017. Microbial decomposition of soil organic matter is mediated by quality and quantity of crop residues: mechanisms and thresholds. Biol. Fertil. Soils. 53(3):287-301.
- Shindoi, M. M. J., J. Prause y P. L. Jover. 2012. Descomposición de *Vigna unguiculata* (caupi) en un Argiudol típico de Colonia Benítez, Chaco. RIA. 38(1):86-90.
- Servicio Meteorológico Nacional-Comisión Nacional del Agua (SMN-CONAGUA). 2018. <https://smn.conagua.gob.mx/es/> Consultado el 15 de noviembre de 2018.
- Statgraphics, C. 2014. Statgraphics Centurion XVII. User Manual. Version, 17 (8.0). Herndon, USA.
- Thönnissen, C., D. J. Midmore, J. K. Ladha, D. C. Olk and U. Schmidhalter. 2000. Legume decomposition and nitrogen release when applied as green manures to tropical vegetable production systems. Agron. J. 92(2):253-260.
- Tighe-Neira, M. R., G. Leonelli, M. Aliaga y M. Rodríguez. 2015. Evaluación de espinillo como abono verde en la producción de biomasa y proteína de acelga. IDESIA. 33(2):137-142.
- Villavicencio-Enríquez, L. 2012. Producción, pérdida de peso y tasas de descomposición de hojarasca en cafetales tradicional y rústico, y selva mediana, en Veracruz, México. Rev. Chapingo Ser. Cienc. for. Ambient. 18(2):159-173.
- Weisany, W., Y. Raei and K. H. Allahverdiipoor. 2013. Role of Some of Mineral Nutrients in Biological Nitrogen Fixation. Bull. Env. Pharmacol. Life Sci. 2(4):77-84.
- Wysokinski, A., D. Kalembasa and S. Kalembasa. 2014. Utilization of nitrogen from different sources by spring triticale (*Triticosecale Wittm. ex A. Camus*) grown in the stand after yellow lupine (*Lupinus luteus* L.). Acta Sci. Pol. Agricultura. 13(2):79-92.
- Zamora-Natera, J., I. Zapata-Hernández y A. Villalvazo-Hernández. 2019. Fijación biológica del nitrógeno en tres especies silvestres del género *Lupinus* (Leguminosae, Papilionoideae) en México. Act. Bot. Mex. 126:e1543.
- Zapata-Hernández, I., J. Zamora-Natera, M. Trujillo-Tapia y E. Ramírez-Fuentes. 2020. ¿La incorporación de residuos de diferentes especies de *Lupinus*, como abono verde, afecta la actividad microbiana del suelo?. Terra Latinoam. 38(1):45-56.
- Zapata, I., M. R. Rodríguez, L. P. M. García, P. E. Salcedo, R. A. H. Lara and N. J. F. Zamora. 2019. Dry matter yield and nitrogen content in *Lupinus* spp. (Leguminosae) with potential as a green manure. Legum. Res. 42(4):523-527.





## Biometric characteristics of winter forage cereals grown under nitrogen fertilization in temperate rain conditions

Características biométricas de los cereales forrajes de invierno cultivados bajo fertilización con nitrógeno en condiciones de lluvia templada

Características biométricas dos cereais forrageiros de inverno crescidos sob fertilização com nitrogênio em condições de chuva temperada

Muhammad Jamil<sup>1,2</sup>, Muhammad Ansar<sup>1</sup>, Zammurad Iqbal Ahmed<sup>1</sup>, Tanveer Ahmed<sup>3</sup>, Muhammad Shehzad<sup>2\*</sup>, Aqeel Ahmad<sup>2</sup> and Imran Mahmood<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Agronomy, Faculty of crop and food sciences, PMAS Arid Agriculture University Rawalpindi. Email: (MJ) [mjamilrajaur@gmail.com](mailto:mjamilrajaur@gmail.com), ; (MA) [muhammad.ansar@uaar.edu.pk](mailto:muhammad.ansar@uaar.edu.pk); ; (ZI) [zammurad@hotmail.com](mailto:zammurad@hotmail.com),  (IM) [imran403@uaar.edu.pk](mailto:imran403@uaar.edu.pk),

 <sup>2</sup>Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Poonch Rawalakot. Email: (MS) [m.shahzaduaf@gmail.com](mailto:m.shahzaduaf@gmail.com), ; (AA) [aqeelao878@gmail.com](mailto:aqeelao878@gmail.com), . <sup>3</sup>Department of Livestock Production and Management, Faculty of Veterinary and Animal Sciences, PMAS Arid Agriculture University Rawalpindi. Email: [tanveer.ahmad@uaar.edu.pk](mailto:tanveer.ahmad@uaar.edu.pk), .

### Abstract

The farmers of hilly areas face severe fodder shortage in winter season except to have only dry stalks of summer cereals. The study aimed to evaluate the adaptability of winter forage cereals (barley, oats, rye and triticale) and to quantify the suitable dose of nitrogen (0, 75, 150 and 225 kg.ha<sup>-1</sup>) for the assessment of biometric and qualitative characteristics of winter forage cereals (WFCs) at booting stage (BS) and milking dough stage (MDS) grown under temperate conditions. Two years (2016-2017 and 2017-2018) field trials were executed at the University of Poonch Rawalakot, Pakistan. Harvested forage then preserved as silage by adding Formic acid and Molasses as additives at the rate of 5 kg.t<sup>-1</sup>. Rye crop in conjunction with 225 kg.ha<sup>-1</sup> nitrogen out yielded greater plant height which

Received: 02-12-2020 • Accepted: 24-02-2021.

\*Corresponding autor. Email: [m.shahzaduaf@gmail.com](mailto:m.shahzaduaf@gmail.com)

led to the highest green fodder (55413 and 43542 kg.ha<sup>-1</sup>) and dry matter yield (188471 and 12440 kg.ha<sup>-1</sup>) during consecutive years 2017 and 2018, respectively. Whereas, oats cultivar performed better for fresh weight, dry weight and leaf area per plant. More crude protein contents were recorded for triticale crop at N3 level with use of molasses during both the years at both cutting stages (booting and milking dough). More crude fibre was noted in barley crop at control level of nitrogen fertilization on both booting and milking dough stage. The correlation analysis revealed direct interrelationship among yield attributes and fodder yield of winter forage cereals and thus indicating the need to supply nitrogen at the rate of 225 kg.ha<sup>-1</sup> for improving biometric characteristics of WFCs.

**Keywords:** yield, silage, nitrogen levels, winter forage cereals

### Resumen

Los agricultores de las zonas montañosas se enfrentan a una grave escasez de forraje en la temporada de invierno, excepto para tener solo tallos secos de cereales de verano. El estudio tuvo como objetivo evaluar la adaptabilidad de los cereales forrajeros de invierno (cebada, avena, centeno y triticale) y cuantificar la dosis adecuada de nitrógeno (0, 75, 150 y 225 kg.ha<sup>-1</sup>) para la valoración de características biométricas y cualitativas de cereales forrajeros de invierno (WFC) en fase de arranque (BS) y fase de grano lechoso (MDS) cultivados en condiciones templadas. Se llevaron a cabo pruebas de campo de dos años (2016-2017 y 2017-2018) en la Universidad de Poonch Rawalakot, Pakistán. El forraje cosechado luego se conserva como ensilado agregando ácido fórmico y melaza como aditivos a razón de 5 kg.t<sup>-1</sup>. El cultivo de centeno en conjunto con 225 kg.ha<sup>-1</sup> de nitrógeno rindió mayor altura de planta lo que llevó a la mayor producción de forraje verde (55413 y 43542 kg.ha<sup>-1</sup>) y de materia seca (188471 y 12440 kg.ha<sup>-1</sup>) durante años 2017 y 2018, respectivamente. Considerando que, el cultivar de avena se comportó mejor en peso fresco, peso seco y área foliar por planta. Se registraron más contenidos de proteína cruda para el cultivo de triticale a nivel N3 con el uso de melaza durante ambos años en ambas etapas de corte (arranque y grano lechoso). Se observó más fibra cruda en el cultivo de cebada al nivel de control de fertilización con nitrógeno tanto en la etapa de arranque como en la etapa de grano lechoso. El análisis de correlación reveló una interrelación directa entre los atributos de rendimiento y el rendimiento de forraje de los cereales forrajeros de invierno, lo que indica la necesidad de suministrar nitrógeno a razón de 225 kg.ha<sup>-1</sup> para mejorar las características biométricas de los WFC.

**Palabras clave:** rendimiento, ensilaje, niveles de nitrógeno, cereales forrajeros de invierno.

### Resumo

Os agricultores de áreas montanhosas enfrentam severa escassez de forragem no inverno, exceto por terem apenas hastes secas de cereais de verão. O estudo



teve como objetivo avaliar a adaptabilidade de cereais forrageiros de inverno (cevada, aveia, centeio e triticale) e quantificar a dose adequada de nitrogênio (0, 75, 150 e 225 kg.ha<sup>-1</sup>) para avaliação de características biométricas e qualitativas de cereais forrageiros de inverno (WFCs) na fase de inicialização (BS) e fase de massa de ordenha (MDS) cultivadas em condições temperadas. Testes de campo de dois anos (2016-2017 e 2017-2018) foram executados na Universidade de Poonch Rawalakot, Paquistão. A forragem colhida e depois preservada como silagem pela adição de ácido fórmico e melaço como aditivos na taxa de 5 kg.t<sup>-1</sup>. A safra de centeio em conjunto com 225 kg.ha<sup>-1</sup> de nitrogênio gerou maior altura de planta, o que levou à maior forragem verde (55413 e 43542 kg.ha<sup>-1</sup>) e produção de matéria seca (188471 e 12440 kg.ha<sup>-1</sup>) durante anos de 2017 e 2018, respectivamente. Já a cultivar de aveia apresentou melhor desempenho para massa fresca, massa seca e área foliar por planta. Mais teores de proteína bruta foram registrados para a cultura do triticale no nível de N3 com uso de melaço durante ambos os anos em ambas as fases de corte (booting e massa de ordenha). Mais fibra bruta foi observada na cultura da cevada no nível de controle da fertilização com nitrogênio, tanto na fase de inicialização quanto na fase de ordenha da massa. A análise de correlação revelou uma inter-relação direta entre os atributos de produção e a produção de forragem de cereais forrageiros de inverno e, portanto, indicando a necessidade de fornecimento de nitrogênio na proporção de 225 kg.ha<sup>-1</sup> para melhorar as características biométricas de WFCs.

**Palavras-chave:** rendimento, silagem, níveis de nitrogênio, cereais forrageiros de inverno

## Introduction

Forages performance in Azad Jammu and Kashmir, Pakistan, always remained despondent because of weather regimes and generation of farm based knowledge. Major elements underlying this inactive performance comprise the slow proportion of scientific invention, development, and inadequate attention towards livestock feeding issues (Govt. of Pakistan, 2017-18). Livestock is a fundamental constituent of agriculture subdivision as 30 - 35% of rural inhabitants of the country are endorsed in livestock enterprises especially in dryland agriculture. The demand for milk, butter, meat, beef, and their by-

## Introducción

El rendimiento de forrajes en Azad Jammu y Kashmir, Pakistán, permanecieron afectados negativamente por los regímenes climáticos y la generación de conocimientos basados en la explotación. Los principales elementos que subrayan este rendimiento inactivo comprenden la lenta proporción de la invención científica, el desarrollo y la atención inadecuada hacia los problemas de alimentación del ganado (Gobierno de Pakistán, 2017-18). La ganadería es un componente fundamental de la subdivisión de la agricultura, ya que entre el 30 y el 35% de los habitantes de las zonas rurales del país están respaldados por empresas ganaderas,

products is rising due to rapidly growing population. In Pakistan, animals are mainly deficiency in protein and energy intake (Khan *et al.*, 2014). Animal performance depends on fodder intake, digestibility, and nutrient utilization efficiency (Lekgari *et al.*, 2008). Conventionally summer browsing and cereal stubble nutrition in winter are the foremost sources of feed for livestock which is nutritionally poor to maintain the health and productivity of animals (Mut *et al.*, 2015). Livestock contributes 58.9% to agriculture value addition, while it contributes 11.1% to the national GDP (Govt. of Pakistan, 2018).

Forage crops in agriculture need a lot of attention for sustainable livestock production. Consistent fodder production is a fundamental prerequisite for boosting the livestock industry in Pakistan. Fodder production is limited because of low fertility of soil, non-availability of improved forage varieties in rainfed regions of the country (Iqbal *et al.*, 2009). The shortage of green fodder during the winter season is even more severe and farmers have no option to feed their animals on dry stalks of summer cereals and grasses in these areas. Therefore, to improve forage production is the need of time to meet the increasing fodder supplies in dryland situations. Different agronomic factors affect yield and quality of forage the most important factor is growth stage of plant at harvest (Mut *et al.*, 2006). The quantity and quality of forage are affected by several factors such as type of crop and cutting

especialmente en la agricultura de secano. La demanda de leche, mantequilla, carne, carne de res y sus subproductos está aumentando debido al rápido crecimiento de la población. En Pakistán, los animales presentan deficiencias principalmente en el consumo de proteínas y energía (Khan *et al.*, 2014). El rendimiento de los animales depende de la ingesta de forraje, la digestibilidad y la eficiencia en la utilización de nutrientes (Lekgari *et al.*, 2008). El pastoreo convencional en verano y la alimentación con rastrojos de cereales en invierno son las principales fuentes de alimentación para el ganado, que es nutricionalmente pobre para mantener la salud y la productividad de los animales (Mut *et al.*, 2015). La ganadería contribuye en un 58,9% al valor añadido de la agricultura, mientras que contribuye en un 11,1% al PIB nacional (Gobierno de Pakistán, 2018).

Los cultivos de forraje en la agricultura necesitan mucha atención para una producción ganadera sostenible. La producción constante de forraje es un requisito fundamental para impulsar la industria ganadera en Pakistán. La producción de forraje es limitada ya que existe una baja fertilidad de los suelos, y existe falta de disponibilidad de variedades de forraje mejoradas en las regiones de secano del país (Iqbal *et al.*, 2009).

La escasez de forraje verde durante la temporada de invierno es aún más severa y los agricultores no tienen otra opción de alimentar a sus animales con los tallos secos de cereales y las hierbas de verano de estas zonas. Por

stage. Agronomic inputs and their application are considered critical to optimize total dry matter yield. Mineral fertilizer including nitrogen is an important energy resource for forage production, and provides essential mineral nutrition for crop growth and development (Li *et al.*, 2016). Furthermore, nitrogen is the topmost limiting nutrient for crop rising in dry areas thus efficient N management strategies often result in large economic benefits to farmers (Worku *et al.*, 2007). Nitrogen is the most important component affecting crop canopy and its growth rate. It is a foremost component in attaining regularly high yields in cereal forages being constituent of many fundamental cell components such as nucleic acids, amino acids, enzymes, and photosynthetic pigments (Amanullah *et al.*, 2008). To maintain green fodder production at a profitable level, it is important to achieve higher use efficiency of nitrogenous fertilizers through proper application (Mut *et al.*, 2006). Barley and oats crop too have testified their performance as forage crop in rainfed region of Azad Jammu and Kashmir, but the potential of rye and triticale cereals is yet required to be explored in these situations (Anwar *et al.*, 2010). In stress environment, it helps crops in establishment and provides forage for longer period of time by delaying maturity. Keeping under consideration the significance of different winter forage cereal crops such as oats, barley, rye and triticale, the present study was carried out to grow these forages at different

lo tanto, mejorar la producción de forraje es la necesidad del momento para satisfacer el creciente suministro de forraje en situaciones de secano. Los diferentes factores agronómicos afectan al rendimiento y la calidad del forraje, siendo el factor más importante la etapa de crecimiento de la planta en el momento de la cosecha (Mut *et al.*, 2006). La cantidad y la calidad del forraje se ven afectadas por varios factores tales como el tipo de cultivo y la etapa de corte. Los insumos agronómicos y su aplicación se consideran críticos para optimizar el rendimiento total de la materia seca. Los fertilizantes minerales, incluido el nitrógeno, son un recurso energético importante para la producción de forraje, y proporcionan una nutrición mineral esencial para el crecimiento y desarrollo de los cultivos (Li *et al.*, 2016). Además, el nitrógeno es el nutriente más limitante para el crecimiento de los cultivos en las zonas secas, por lo que las estrategias de gestión eficiente del N suelen reportar grandes beneficios económicos para los agricultores (Worku *et al.*, 2007). El nitrógeno es el componente más importante que afecta la cubierta vegetal y su tasa de crecimiento. Es un componente primordial para lograr rendimientos regularmente elevados en los cereales de forrajes, al ser constituyente de muchos componentes celulares fundamentales como ácidos nucleicos, aminoácidos, enzimas y pigmentos fotosintéticos (Amanullah *et al.*, 2008). Para mantener la producción de forraje verde a un nivel rentable, es importante alcanzar una mayor

nitrogen regimes under temperate conditions with the objectives to a) identify the suitable winter forage cereal and its cutting stage for higher yield under temperate conditions, b) Standardize the amount of nitrogenous fertilizer for winter forage cereals and c) to reduce the protein loss during ensiling by adding different preservatives.

## Materials and methods

### Experimental site description

The research was carried out at the University of Poonch Rawalakot, Azad Jammu and Kashmir, Pakistan (33.85° N, 73.76°E) which is located at an altitude of 1638 meters (Zafar *et al.*, 2013). The study was executed during spring season of 2017 and 2018. The soil of the experimental area is classified as Thermic Lithic Eutrudepts, while it has temperate climate as per Koppen classification scheme (Geiger, 1954). The experimental area receives an annual precipitation of about 700-800 mm, while mean temperature remains 5-28°C (Khaliq and Abbasi, 2015). A pre-sowing physico-chemical analysis revealed that soil of the experimental block was of silt-loam type, while it was slightly of alkaline nature with pH of around 8. It contains P 5.4 mg.kg<sup>-1</sup>, K 130 mg.kg<sup>-1</sup> and EC 1.08 dS.m<sup>-1</sup>. It was also found to be rich in organic matter (7%).

### Detail of experiment

Treatments included four winter forage cereals i.e. Barley,

eficiencia en el uso de fertilizantes nitrogenados mediante una aplicación adecuada (Mut *et al.*, 2006). Los cultivos de cebada y avena también han demostrado su rendimiento como cultivos de forraje en las zonas de secano de Azad Jammu y Kashmir, pero el potencial de los cereales de centeno y triticale aún debe ser explorado en estas situaciones (Anwar *et al.*, 2010). El estrés ambiental, ayuda a los cultivos a establecerse y proporciona forraje para periodos de tiempo más largos al retrasar la madurez. Tomando en cuenta la importancia de los diferentes cultivos de cereales forrajeros de invierno tales como, la avena, la cebada, el centeno y el triticale, el presente estudio se llevó a cabo para evaluar estos forrajes en diferentes regímenes de nitrógeno bajo condiciones templadas con los objetivos de: a) identificar el cereal forrajero de invierno adecuado y su fase de corte para obtener un mayor rendimiento en condiciones templadas, b) estandarizar la cantidad de abono nitrogenado para los cereales forrajeros de invierno y c) reducir la pérdida de proteína durante el ensilado añadiendo diferentes conservantes.

## Materiales y métodos

### Descripción del sitio experimental

La investigación se llevó a cabo en la Universidad de Poonch Rawalakot, Azad Jammu y Kashmir, Pakistán (33,85°N, 73,76°E) la cual se encuentra localizada a una altitud de 1638 metros (Zafar *et al.*, 2013). El estudio

Oats, Rye and Triticale and four nitrogen levels (0, 75, 150 and 225 kg.ha<sup>-1</sup>). The experiment was laid out in the factorial arrangement of randomized complete block design (RCBD) and was replicated thrice. The net plot size was maintained at 12 m<sup>2</sup>. The crops were harvested at BS and MDS, while harvested forage was preserved in silage form for three weeks by adding folic acid and molasses as preservatives.

### Crop management

In order to prepare a fine seed bed, the experimental block was ploughed thrice using tractor-mounted plough. Each ploughing was followed by planking using a wooden plank to pulverize the soil. Planting of crops was carried out with hand drill at a row spacing of 22.5 cm. The recommended dose of mineral phosphorus (50 kg.ha<sup>-1</sup> elemental P) and Potassium (25 kg.ha<sup>-1</sup> elemental K) were applied in the form single super phosphate and sulphate of potassium. Nitrogen was applied as per treatment in the form of urea. All the fertilizers were applied as basal dose. Approved seed rate of 80 kg.ha<sup>-1</sup> was used for sowing of barley, oats and triticale while rye crop was sown at the rate of 40 kg.ha<sup>-1</sup>. The non-experimental area was maintained around the experimental block where respective crop was broadcasted.

### Data Recordings

Following observations were noted from experiment at the time of booting and milking

se realizó durante la temporada de primavera de 2017 y 2018. El suelo del área experimental se clasifica como Eutrudepts lítico térmico, mientras que tiene un clima templado según el esquema de clasificación de Koppen (Geiger, 1954). El área experimental recibe una precipitación anual de alrededor de 700-800 mm, mientras que la temperatura media permanece entre 5-28°C (Khaliq y Abbasi, 2015). Un análisis físico-químico previo a la siembra reveló que el suelo del área experimental fue de tipo limo-arenoso, mientras que era de naturaleza ligeramente alcalina, con un pH de alrededor de 8. Este contiene P 5,4 mg.kg<sup>-1</sup>, K 130 mg.kg<sup>-1</sup> y CE 1,08 dS. m<sup>-1</sup>. También se encontró que era rico en materia orgánica (7%).

### Detalles del experimento

Los tratamientos incluyeron cuatro cereales forrajeros de invierno tales como, la cebada, la avena, el centeno y el triticale, y cuatro niveles de nitrógeno (0, 75, 150 y 225 kg.ha<sup>-1</sup>). El experimento se realizó mediante un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) y se repitió tres veces. El tamaño de la parcela neta se mantuvo en 12 m<sup>2</sup>. Los cultivos se cosecharon en BS y MDS, mientras que el forraje cosechado se conservó en forma de ensilado durante tres semanas añadiendo ácido fólico y melaza como conservantes.

### Manejo del cultivo

Con el fin de preparar una cama de semilla fina, el terreno experimental fue arado tres veces con un arado montado en un tractor. Cada arada iba seguida de un cepillado con una tabla de madera para pulverizar el suelo. La

dough stage. For measuring all agronomic traits quadrates were thrown randomly in each experimental plot. Plant height (cm), fresh weight plant<sup>-1</sup> (g), dry weight plant<sup>-1</sup> (g), green fodder yield (kg.ha<sup>-1</sup>) and dry matter yield (kg.ha<sup>-1</sup>) were recorded. Dry matter yield was documented after drying of plants in oven (Nabertherm TR-450) at 65°C for 48 hours. Fresh samples were dried in oven till constant weight than finally weighed and converted into kg.ha<sup>-1</sup> with the use of Kern EMB portable balance. Likewise, leaf area of ten randomly selected plants from each plot was detailed at both stages with the usage of leaf area meter model no. (Ci-202) and average was noted. The chopped fodder was preserved as silage by adding folic acid and molasses as preservative. Crude protein (%) and crude fibre (%) were also determined through standard procedure (AOAC, 2012)

### Statistical analysis

The recorded data were subjected to analysis of variance technique using statistical software package “Statistix 8.1 version” (Steel *et al.*, 1997). The significance of the treatment means was determined by using Tukey’s Honest Significant test at 5% level of probability

## Results and discussions

Significant ( $p \leq 0.05$ ) interaction was observed between crops and nitrogen levels for agronomic

plantación de los cultivos se realizó con un taladro manual con una separación entre hileras de 22,5 cm. Se aplicaron las dosis recomendadas de fósforo mineral (50 kg.ha<sup>-1</sup> de P elemental) y de potasio (25 kg.ha<sup>-1</sup> de K elemental) en forma de superfosfato simple y sulfato de potasio. El nitrógeno se aplicó como un tratamiento en forma de urea. Todos los fertilizantes se aplicaron como dosis basal. Para la siembra de cebada, avena y triticale se utilizó una cantidad de semilla certificada de 80 kg.ha<sup>-1</sup>, mientras que el cultivo de centeno se sembró a una dosis de 40 kg.ha<sup>-1</sup>. El área no experimental se mantuvo alrededor del bloque experimental donde se sembró el cultivo respectivo.

### Registro de datos

En el experimento se realizaron observaciones tomando las medidas en fases de arranque y de grano lechoso. Para medir todas las características agronómicas se arrojaron cuadrados al azar en cada parcela experimental. Se registró la altura de la planta (cm), el peso fresco de la planta<sup>-1</sup> (g), el peso seco de la planta<sup>-1</sup> (g), el rendimiento del forraje verde (kg.ha<sup>-1</sup>) y el rendimiento de la materia seca (kg.ha<sup>-1</sup>). El rendimiento de la materia seca se documentó después del secado de las plantas en un horno (Nabertherm TR-450) a 65°C por 48 horas. Las muestras frescas se secaron en el horno hasta alcanzar un peso constante y luego se pesaron y se convirtieron en kg.ha<sup>-1</sup> con el uso de la balanza portátil Kern EMB. Asimismo, se detalló el área foliar de diez plantas seleccionadas al azar de cada parcela en ambas etapas

and yield related traits at booting and milking stage during both years of study (2016-17 and 2017-18) (Tables 1, 2). Interactive effect of  $N_3C_3$  was superior for plant height during 2016-17 but remained at par in 2017-18 at both booting and milking dough stages. It was probably a genetically controlled character and got affected by various factors such as seed vigour and soil conditions. This study corroborate with the results of Kim *et al.* (2017), who verified that among small grain winter cereals, rye and triticale produced more forage yield as a result of more number of plant, profuse tillers and taller plants, especially in low temperature environments, because of its comparatively low temperature requirements for growth as well as distinct cold stress tolerance. Similarly, nitrogen is also important nutrient which affects growth attributes like plant height, number of tillers, these results are in continuity with Gangwar and Lodhi (2018) who reported that biometric expressions were affected by disparity among nitrogen levels, in terms of main shoot height and number of tillers.plant<sup>-1</sup>. The results of this experiment was in agreement with Ahmad *et al.* (2011) who stated that tillers. palnt<sup>-1</sup> and plant height of forage oat was significantly affected by different levels of nitrogen fertilizer.

con el uso del medidor de área foliar modelo N° (Ci-202) y se anotó la media. El forraje picado se conservó como ensilado añadiendo ácido fólico y melaza como conservante. También se determinaron la proteína cruda (%) y la fibra cruda (%) mediante el procedimiento estándar (AOAC, 2012)

### **Análisis estadístico**

Los datos registrados fueron sometidos a la técnica de análisis de varianza utilizando el paquete de software estadístico Statistix versión 8.1 (Steel *et al.*, 1997). La significación de las medias de los tratamientos se determinó utilizando la prueba de Tukey a un nivel de probabilidad del 5%.

### **Resultados y discusión**

Se observó una interacción significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre los cultivos y los niveles de nitrógeno para las características agronómicas, relacionadas con el rendimiento en las etapas de arranque y grano lechoso durante los dos años de estudio (2016-17 y 2017-18) (Cuadros 1, 2). El efecto de la interacción de  $N_3C_3$  fue superior para la altura de la planta durante 2016-17, pero se mantuvo a la par en 2017-18 tanto en las etapas de arranque como de grano lechoso. Probablemente, se trata de un carácter controlado genéticamente y se ve afectado por diversos factores como el vigor de la semilla y las condiciones del suelo. Este estudio corrobora los resultados de Kim *et al.* (2017), quienes verificaron que entre los cereales de invierno de grano pequeño, el centeno y el triticale produjeron más rendimiento de forraje, como resultado

**Table 1: Biometric assessment of winter forage cereals with various nitrogen levels at booting stage under agro climatic conditions of Rawalakot, Azad Jammu and Kashmir, and Pakistan.**

**Cuadro 1: Evaluación biométrica de los cereales forrajeros de invierno con varios niveles de nitrógeno en la fase de arranque en las condiciones agroclimáticas de Rawalakot, Azad Jammu y Kashmir, Pakistán**

Treatments	PH (cm)	LAPP (cm <sup>2</sup> )		FWPP (g)		DWPP (g)		GFY (kg ha <sup>-1</sup> )		DMY (kg ha <sup>-1</sup> )			
		2016-17	2017-18	2016-17	2017-18	2016-17	2017-18	2016-17	2017-18	2016-17	2017-18		
N <sub>0</sub> C <sub>1</sub>	44.9 k	44.7 i	53.3g	45.7 i	69.3j	56.1b	23.2 j	14.0h	13117n	10757k	4372n	2017-18	3073j
N <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	60.1 h	58.6 f	58.59f	51.00 f	85.8h	65.0g	28.7 h	16.6g	20508l	16318i	6836l	4662h	5447g
N <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	66.56f	64.7cd	61.48e	53.89 e	103.1e	72.8ef	34.5 e	18.2ef	25196j	19065h	8399j	5620fg	3794i
N <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	67.3de	65.1c	63.98d	56.39 d	121.2b	86.9bc	40.6 b	21.7bc	25801j	19669h	8600j	5503m	5501g
N <sub>0</sub> C <sub>2</sub>	50.1i	48.0 g	65.51d	57.92 d	94.2f	73.1e	31.5 f	18.3e	16509m	13279j	5503m	8356j	6140f
N <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	63.8g	63.0e	72.9b	65.31 b	116.0d	83.7cd	38.8 d	20.9cd	27980i	19252h	9327i	7097e	7038e
N <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	69.3cd	68.8b	76.44a	68.85 a	128.9a	91.7a	43.1 a	22.9a	32829g	24841f	10943g	14856c	10242b
N <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	69.7cd	69.2ab	77.96a	70.36 a	130.7a	91.7a	43.7 a	23.0a	53930b	42376a	17977b	12107a	12440a
N <sub>0</sub> C <sub>3</sub>	49.4j	49.0 g	37.36k	29.76 k	46.0 i	37.2k	15.4 l	9.3k	29419h	35848b	7871k	5535fg	7785d
N <sub>1</sub> C <sub>3</sub>	65.1efg	63.4de	44.35j	36.75 j	58.8k	45.7j	19.7 k	11.4j	44569c	26714e	11507f	9199c	9735bc
N <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	73.13ab	69.7a	46.53i	38.93 i	68.9j	51.9i	23.0 j	13.0i	55413a	18992h	7871k	5535fg	7785d
N <sub>3</sub> C <sub>3</sub>	74.93 a	70.3a	48.32h	40.72 h	73.7i	56.4h	24.6 I	14.0h	23613k	31564 d	13699 e	9199c	9735bc
N <sub>0</sub> C <sub>4</sub>	47.1jk	46.2 h	57.15f	49.56 f	89.3g	69.4f	29.9 g	17.3f	34520f	26714e	11507f	9199c	9735bc
N <sub>1</sub> C <sub>4</sub>	64.4fg	64.0c	65.63d	58.04 d	105.1e	81.6d	35.14 e	20.4d	41096e	31564 d	13699 e	9199c	9735bc
N <sub>2</sub> C <sub>4</sub>	70.4 c	68.8b	69.25c	61.66 c	117.5cd	87.9 b	39.3 cd	22.0b	42840d	33405 c	14280 d	9735bc	9735bc
N <sub>3</sub> C <sub>4</sub>	70.9bc	70.2ab	71.59b	64.00 b	119.5bc	88.8ab	40.0bc	22.1ab	1668	209	613	613	613
<b>C.V</b>	<b>2.3</b>	<b>1.45</b>	<b>1.77</b>	<b>1.77</b>	<b>2.7</b>	<b>3.50</b>	<b>0.57</b>	<b>0.88</b>	<b>872</b>	<b>1668</b>	<b>209</b>	<b>613</b>	<b>613</b>

N<sub>0</sub>= 0 kg N ha<sup>-1</sup>, N<sub>1</sub>= 75 kg N ha<sup>-1</sup>, N<sub>2</sub>= 150 kg N ha<sup>-1</sup>, N<sub>3</sub>= 225 kg N ha<sup>-1</sup>, C<sub>1</sub>= Barley, C<sub>2</sub>= Oats, C<sub>3</sub>= Rye, C<sub>4</sub>=Triticale, C.V= Tukey's Critical value. Values having different letters with in same column varies significantly at P (0.05) PH=Plant Height, LAPP=Leaf Area plant<sup>-1</sup>, FWPP= Fresh weight plant<sup>-1</sup>, DWPP= Dry weight plant<sup>-1</sup>, GFY= Green fodder yield, DMY= Dry matter yield  
N<sub>0</sub>= 0 kg N ha<sup>-1</sup>, N<sub>1</sub>= 75 kg N ha<sup>-1</sup>, N<sub>2</sub>= 150 kg N ha<sup>-1</sup>, N<sub>3</sub>= 225 kg N ha<sup>-1</sup>, C<sub>1</sub>= Cebada, C<sub>2</sub>= Avena, C<sub>3</sub>= Centeno, C<sub>4</sub>= Triticale, C.V= Valor crítico de Tukey. Los valores que tienen letras diferentes en la misma columna varían significativamente a P (0.05) PH=Altura de la planta, LAPP=Área foliar planta<sup>-1</sup>, FWPP= Peso fresco de la planta, DWPP= Peso seco de la planta<sup>-1</sup>, GFY= Rendimiento de forraje verde, DMY= Rendimiento de materia seca



Similar results were reported by Li *et al.* (2010) and mentioned that increase in nitrogen up to 300 kg.ha<sup>-1</sup> improved plant height in wheat crop. Possible justification for this could be rate of nitrogen in refining growth features of crop plant. Although oat (C<sub>2</sub>) having more fresh weight, dry weight and leaf area per plant with N<sub>3</sub> (225 kg N.ha<sup>-1</sup>) remained inferior in yield than Rye (C<sub>3</sub>) at BS and MD stage during both the years. Oat crop fertilized with N<sub>2</sub> (150 kg N.ha<sup>-1</sup>) showed non-significant difference from N<sub>3</sub> for fresh weight, dry weight and leaf area per plant. This might be due to more assimilates of photosynthesis. The results of present study are consistence with those of Bilal *et al.* (2017) who confirmed that plant morphological parameters, fresh weight, dry weight was most receptive to nitrogen fertilization and every successive rise in nitrogen dose expressively produced taller plants oat forage crop. Nitrogen boosts meristem and photosynthetic efficacy by regulating up the cell elongation, division and chlorophyll substances of leaves and it reflects the higher DMY. Furthermore, observation of these findings was in contrast with Zhang *et al.* (2017) who reported that chemical N fertilizer input increased soil water recharge, grain yield and WUE as well, but no further increases were observed when N rate exceeded 75 or 150 kg N.ha<sup>-1</sup> in most cases of winter wheat. These results are also coincides with the observations of Ahmad *et al.* (2011) who reported that there was a substantial effect of inorganic sources of fertilizers on

de un mayor número de plantas, macollas profusas y plantas más altas, especialmente en entornos de baja temperatura, debido a sus requisitos de temperatura comparativamente bajos para el crecimiento, así como a su distinta tolerancia al estrés por frío. De igual forma, el nitrógeno es también un nutriente importante que afecta los atributos de crecimiento tales como la altura de la planta y el número de tallos; estos resultados están en concordancia con lo reportado por Gangwar y Lodhi (2018), quienes reportaron que las expresiones biométricas se vieron afectadas por la disparidad entre los niveles de nitrógeno, en términos de la altura del brote principal y el número de macollas.planta<sup>-1</sup>. Los resultados de este experimento coinciden con Ahmad *et al.* (2011), quienes afirmaron que la altura de las macollas.planta<sup>-1</sup> y la altura de la planta de avena forrajera se vieron significativamente afectadas por diferentes niveles de fertilizante nitrogenado.

Se reportaron resultados similares por Li *et al.* (2010) y mencionaron que el aumento de nitrógeno hasta 300 kg.ha<sup>-1</sup> mejoró la altura de la planta en el cultivo de trigo. Una posible justificación para esto podría ser la tasa de nitrógeno en el perfeccionamiento de las características de crecimiento de la planta de cultivo. Aunque la avena (C<sub>2</sub>) tuvo más peso fresco, peso seco y área foliar por planta con N<sub>3</sub> (225 kg N.ha<sup>-1</sup>) siguió siendo inferior en rendimiento que el centeno (C<sub>3</sub>) en la etapa BS y MDS durante ambos años. El cultivo de avena fertilizado con N<sub>2</sub> (150 kg N.ha<sup>-1</sup>) no mostró diferencias significativas con respecto

number of leaves per plant in forage oat that ultimately leads to higher leaf area. The data for green fodder yield and dry matter yield exhibited maximum value in  $N_3C_3$  that was followed by  $N_2C_3$  in 2016-17, whereas at par in 2017-18 at Booting stage. Moreover, at milking dough stage green fodder and dry matter yield was found utmost in  $N_3C_3$  compared to rest of the treatments, followed by  $N_2C_3$  during consecutive years.

The plants supplied with premier dose of nitrogen bear more leaves and therefore, produced the highest leaf to stem ratio which leads to maximum green fodder yield. In contrast to our findings Khan *et al.* (2014) documented that under the agro climatic conditions of Sargodha, Pakistan, the higher yields of fodder in oat can be probably accredited to their greater leaf area, responsible for more photosynthetic efficacy, having high aptitude to hoard assimilative products of photosynthesis. Winter forage cereals were significantly different for their DMY could be the possible reason for those WFCs has different relative performance for biometric growth characters results are in accordance with Tawfiq and Muhammed (2014) whereas, Geren (2014) reported difference in DMY of winter cereals was due to encroachment in growth stage. As harvesting of winter cereals was delayed DMY increased considerably. Kim *et al.* (2017) examined significant difference between mean and temporal forage yield among winter cereals under different climatic conditions rye and triticale produced

a  $N_3$  en cuanto a peso fresco, peso seco y área foliar por planta. Esto podría deberse a un mayor número de asimilados de la fotosíntesis. Los resultados del presente estudio coinciden con aquellos reportados por Bilal *et al.* (2017) quienes confirmaron que los parámetros morfológicos de la planta, el peso fresco y el peso seco, fueron los más receptivos a la fertilización nitrogenada y que cada aumento sucesivo de la dosis de nitrógeno producía plantas más altas en el cultivo forrajero de avena. El nitrógeno aumenta el meristemo y la eficacia fotosintética al regular la elongación celular, la división y las sustancias clorofílicas de las hojas y refleja el mayor DMY. Además, la observación de estos resultados contrasta con la de Zhang *et al.* (2017), quienes informaron que el aporte de fertilizantes químicos de N aumentó la recarga de agua del suelo, el rendimiento del grano y el WUE, pero no se observaron más aumentos cuando la tasa de N superó los 75 o 150 kg N.ha<sup>-1</sup> en la mayoría de los casos de trigo de invierno. Estos resultados también coinciden con las observaciones de Ahmad *et al.* (2011), quienes informaron que hubo un efecto sustancial de las fuentes inorgánicas de fertilizantes en el número de hojas por planta en la avena forrajera que, en última instancia, conduce a una mayor área foliar. Los datos de rendimiento de forraje verde y rendimiento de materia seca mostraron el valor máximo en  $N_3C_3$  que fue seguido por  $N_2C_3$  en 2016-17, mientras que a la par en 2017-18 en la etapa de arranque. Además, en la

**Table 2: Biometric assessment of winter forage cereals with various nitrogen levels at milking dough stage under agro climatic conditions of Rawalakot, Azad Jammu and Kashmir, Pakistan**

**Cuadro 2. Evaluación biométrica de cereales forrajeros de invierno con distintos niveles de nitrógeno en la fase de grano lechoso en las condiciones agroclimáticas de Rawalakot, Azad Jammu y Kashmir, Pakistán**

Treatments	PH (cm)		LAPP (cm <sup>2</sup> )		FWPP (g)		DWPP (g)		GFY (kg/ha <sup>1</sup> )		DMY (kg/ha <sup>1</sup> )	
	2016-17	2017-18	2016-17	2017-18	2016-17	2017-18	2016-17	2017-18	2016-17	2017-18	2016-17	2017-18
N <sub>0</sub> C <sub>1</sub>	78.5i	76.6k	52.54 j	50.23j	73.6i	69.3j	76.6k	78.5i	52.54 j	50.23j	73.6i	69.3j
N <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	102.2f	100.4h	57.78 i	54.99i	91.2g	85.8h	102.2f	100.4h	57.78 i	54.99i	91.2g	85.8h
N <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	112.7cd	110.9de	61.76 h	58.61h	109.6d	103.1 e	112.7cd	110.9de	61.76 h	58.61h	109.6d	103.1 e
N <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	113.5c	111.6d	63.06gh	59.79gh	124.7bc	121.2b	113.5c	111.6d	63.06gh	59.79gh	124.7bc	121.2b
N <sub>0</sub> C <sub>2</sub>	84.2g	82.3j	65.05fg	61.60fg	100.1e	94.2f	84.2g	82.3j	65.05fg	61.60fg	100.1e	94.2f
N <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	109.8e	108.0ef	74.8bc	70.52bc	123.3c	116.0d	109.8e	108.0ef	74.8bc	70.52bc	123.3c	116.0d
N <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	119.8b	118.6a,c	77.52ab	72.93ab	133.9a	128.9a	119.8b	118.6a,c	77.52ab	72.93ab	133.9a	128.9a
N <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	120.5ab	116.5c	78.44 a	73.77a	135.4a	130.7a	120.5ab	116.5c	78.44 a	73.77a	135.4a	130.7a
N <sub>0</sub> C <sub>3</sub>	85.9g	84.0i	32.23 i	31.76i	48.9k	46.0i	85.9g	84.0i	32.23 i	31.76i	48.9k	46.0i
N <sub>1</sub> C <sub>3</sub>	110.6de	104.6g	42.70 k	41.28k	62.51j	58.8k	110.6de	104.6g	42.70 k	41.28k	62.51j	58.8k
N <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	121.4ab	119.5a,c	43.87 k	42.71k	73.2i	68.9j	121.4ab	119.5a,c	43.87 k	42.71k	73.2i	68.9j
N <sub>3</sub> C <sub>3</sub>	122.5a	120.6a	44.28 k	42.34k	78.3h	73.6i	122.5a	120.6a	44.28 k	42.34k	78.3h	73.6i
N <sub>0</sub> C <sub>4</sub>	81.1 h	79.3jk	56.58 I	53.90i	94.9f	89.3g	81.1 h	79.3jk	56.58 I	53.90i	94.9f	89.3g
N <sub>1</sub> C <sub>4</sub>	111.5c,e	106.5fg	66.98 ef	63.35ef	111.6d	105.0e	111.5c,e	106.5fg	66.98 ef	63.35ef	111.6d	105.0e
N <sub>2</sub> C <sub>4</sub>	119.8b	117.5bc	69.85de	65.96de	124.9bc	117.5cd	119.8b	117.5bc	69.85de	65.96de	124.9bc	117.5cd
N <sub>3</sub> C <sub>4</sub>	122.3ab	120.5ab	72.06cd	67.97cd	127.06b	119.5bc	122.3ab	120.5ab	72.06cd	67.97cd	127.06b	119.5bc
<b>C.V</b>	<b>2.64</b>	<b>3.09</b>	<b>2.9</b>	<b>2.67</b>	<b>2.53</b>	<b>2.46</b>	<b>2.64</b>	<b>3.09</b>	<b>2.9</b>	<b>2.67</b>	<b>2.53</b>	<b>2.46</b>

N = 0 kg N ha<sup>-1</sup>, N<sub>1</sub> = 75 kg N ha<sup>-1</sup>, N<sub>2</sub> = 150 kg N ha<sup>-1</sup> and N<sub>3</sub> = 225 kg N ha<sup>-1</sup>. C = Bapley, C<sub>2</sub> = Oats, C<sub>3</sub> = Rye, C<sub>4</sub> = Triticale, C.V = Triticale, C.V = Valor crítico de Tukey. Los valores que tienen letras diferentes en la misma columna varían significativamente a P (0.05) PH=Plant Height, LAPP=Leaf Area plant<sup>-1</sup>, FWPP= Fresh weight plant<sup>-1</sup>, DWPP= Dry weight plant<sup>-1</sup>, GFY= Green fodder yield, DMY= Dry matter yield.

N<sub>0</sub> = 0 kg N ha<sup>-1</sup>, N<sub>1</sub> = 75 kg N ha<sup>-1</sup>, N<sub>2</sub> = 150 kg N ha<sup>-1</sup> y N<sub>3</sub> = 225 kg N ha<sup>-1</sup>. C<sub>1</sub> = Cebada, C<sub>2</sub> = Avena, C<sub>3</sub> = Centeno, C<sub>4</sub> = Triticale, C.V = Valor crítico de Tukey. Los valores que tienen letras diferentes en la misma columna varían significativamente a P (0.05) PH=Altura de la planta, LAPP=Área foliar planta<sup>-1</sup>, FWPP= Peso fresco de la planta<sup>-1</sup>, DWPP= Peso seco de la planta<sup>-1</sup>, GFY= Rendimiento de forraje verde, DMY= Rendimiento de materia seca

more forage yield than oats and wheat during and across the season. Crude protein is the most essential component for estimating the quality of silage especially in WFCs (Ronga *et al.* 2020). During both the years at different locations all the WFCs at various NLs proved differences among each other for crude protein contents. During both the years extreme values of CP contents were recorded for triticale crop at  $N_3$  level of N with use of molasses at both harvesting stages (Table 3). Triticale is a hybrid of wheat and rye, which inherited the ability of rye to survive under severe drought conditions, but has higher protein value than rye (Glamočlija *et al.*, 2018). Crude protein increases with progression in growing stage of winter cereals which is in accordance with Geren (2014). Similarly, Li *et al.* (2016) confirmed that crude protein content of wheat silage was increased significantly with increasing N up to  $225 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ , while they no longer increased at N up to  $300 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ . Furthermore, Obour *et al.* (2018) testified that CP contents of oat forage were passively increased with the increment of nitrogen application rate. The aerobic stability of high moisture winter cereal silages was linearly increased with the application rate of chemical additives. Malik *et al.* (2015) stated that high CP content at early vegetative stage was due to more leafy and luscious nature of plant at this stage. Dhillon *et al.* (2019) recognized that CP content was decreased with increase in age of crop plant. Landry *et al.* (2019) reported that winter cereal cover crops such

fase de grano lechoso, el rendimiento de forraje verde y de materia seca fue mayor en  $N_3C_3$  en comparación con el resto de los tratamientos, seguido de  $N_2C_3$  durante los años consecutivos

Las plantas tratadas con dosis de nitrógeno de primer nivel tienen más hojas y, por lo tanto, producen la mayor relación hoja/tallo, lo que conduce a un máximo rendimiento de forraje verde. En contraste con nuestros hallazgos, Khan *et al.* (2014) reportaron que bajo condiciones agroclimáticas de Sargodha, Pakistán, los mayores rendimientos de forraje en la avena pueden deberse probablemente a su mayor área foliar, responsable de una mayor eficacia fotosintética, teniendo una alta aptitud para acaparar productos asimilables de la fotosíntesis. Los cereales forrajeros de invierno fueron significativamente diferentes para su DM<sub>Y</sub>, podría ser la posible razón por la que esos WFC tienen un rendimiento relativo diferente para los caracteres biométricos de crecimiento. Los resultados están de acuerdo con Tawfiq y Muhammed (2014) mientras que, Geren (2014) informó que la diferencia en DM<sub>Y</sub> de los cereales de invierno fue debido a la sobrepoblación en la etapa de crecimiento. A medida que se retrasa la cosecha de los cereales de invierno, el DMS aumenta considerablemente. Kim *et al.* (2017) determinaron diferencias significativas entre rendimiento medio y temporal del forraje entre los cereales de invierno bajo diferentes condiciones climáticas; el centeno y el triticale produjeron más rendimiento de forraje que la avena y el trigo durante y a lo largo de la temporada. La proteína cruda es el

as wheat, rye and triticale as spring forage shown significant increase in CP values with the increment of N rates while on other hand CP contents were decreased as the advancement of growth from flag leaf stage to heading stage. Barley crop was ahead of other cereal crops for crude fibre, while lowest value of crude fibre was noted in rye crop (Table 3). Crude fibre decreases when the level of nitrogen increases. Silage preserved by adding molasses remained higher for crude fibre analysis during both the years and at both harvesting stages. Results of these findings were in line with Li *et al.* (2016) and Surber *et al.* (2011) who confirmed that with increasing rate of N application CF contents of whole wheat crop silage was decreased. Furthermore, Morais *et al.* (2017) the use of chemical additives are justified to improve aerobic stability of high moisture cereal silages. The graph displayed linear increase for numbers of plants with green fodder yield showing positive correlation, depicting that taller plants have the potential to yield higher biomass.

Furthermore, association between plant height and number of tillers with green fodder yield presented in Figure 1 also exhibited positive linear correlation among each other with fresh fodder yield indicating the need to breed forage varieties having higher potential for crop plant height and tillers.plant<sup>-1</sup>. The individual relationship showed strongly positive while cumulative relationship with nitrogen doses showed moderate association among variables. values of our correlation

componente más esencial para estimar la calidad del ensilado, especialmente en los WFC (Ronga *et al.* 2020). Durante los dos años y en las diferentes localizaciones, todos los WFC en varios NL demostraron diferencias entre sí en cuanto al contenido de proteína cruda. En ambos años se registraron valores extremos de contenido de PC en el cultivo de triticale con el nivel de N<sub>3</sub> y el uso de melaza en ambas etapas de la cosecha (Cuadro 3). El triticale es un híbrido de trigo y centeno, que heredó la capacidad del centeno para sobrevivir en condiciones de sequía severa, pero tiene mayor valor proteico que el centeno (Glamočlija *et al.*, 2018). La proteína cruda aumenta con la progresión en la fase de crecimiento de los cereales de invierno, lo que coincide con Geren (2014). Del mismo modo, Li *et al.* (2016) confirmaron que el contenido de proteína cruda del ensilado de trigo se incrementó significativamente con el aumento de N hasta 225 kg.ha<sup>-1</sup>, mientras que ya no aumentó con N hasta 300 kg.ha<sup>-1</sup>. Además, Obour *et al.* (2018) atestiguaron que los contenidos de PC del forraje de avena se incrementaron pasivamente con el aumento de la tasa de aplicación de nitrógeno. La estabilidad aeróbica de los ensilados de cereales de invierno de alta humedad se incrementó linealmente con la tasa de aplicación de aditivos químicos. Malik *et al.* (2015) afirmaron que el alto contenido de PC en la etapa vegetativa temprana se debió a la naturaleza más frondosa y exuberante de la planta en esta etapa. Dhillon *et al.* (2019) reconocieron que el contenido de PC disminuía con el aumento de la edad

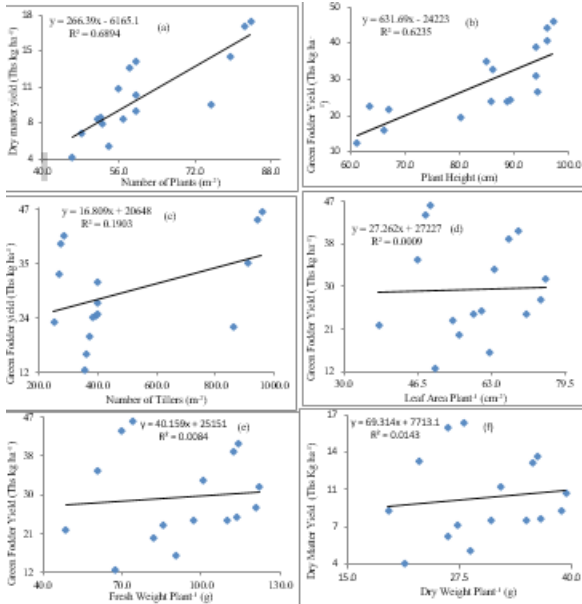
**Table-3: Crude protein and Crude Fiber (%) content in preserved silage of winter forage cereals at booting and milking dough stage grown under varying nitrogen levels during 2016-17 and 2017-18 at Rawalakot, Azad Jammu and Kashmir, Pakistan**

**Cuadro 3. Contenido de proteína cruda y Fibra cruda (%) en el ensilado conservado de cereales forrajeros de invierno en la fase de arranque y de grano lechoso cultivados bajo diferentes niveles de nitrógeno durante 2016-17 y 2017-18 en Rawalakot, Azad Jammu y Kashmir, Pakistán.**

crops	Additive	CP-BS (2016-17)				CP-MDS (2016-17)				CF-BS (2016-17)				CF-MDS (2016-17)			
		N <sub>0</sub>	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>0</sub>	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>0</sub>	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>0</sub>	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>
C1	Con	9.0	10.1	10.8	11.0	6.9	7.9	8.6	8.8	29.9	29.1	28.3	27.8	31.7	31.6	30.8	30.4
	FA	9.1	10.2	10.9	11.1	7.0	8.0	8.7	8.9	29.2	29.1	28.3	27.9	31.7	31.6	30.9	30.4
	Mol	9.2	10.3	11.0	11.2	7.1	8.1	8.8	9.0	29.2	29.7	28.9	28.5	32.4	32.2	31.5	31.0
C2	Con	9.4	9.9	10.1	10.7	7.2	7.7	8.0	8.5	28.3	27.4	25.7	24.4	30.8	30.0	28.3	27.1
	FA	9.5	10.0	10.4	11.2	7.4	7.8	8.2	9.0	28.3	27.5	25.7	24.4	30.9	30.0	28.3	27.1
	Mol	9.6	10.0	10.4	11.2	7.4	7.8	8.3	9.1	28.9	28.1	26.2	24.9	31.5	30.6	28.9	27.6
C3	Con	9.7	10.0	10.8	10.9	7.6	7.8	8.6	8.7	23.1	22.8	22.5	21.1	25.8	25.3	25.3	23.9
	FA	9.8	10.1	10.9	11.0	7.7	7.9	8.7	8.8	23.1	22.8	22.3	21.2	25.9	25.1	25.1	24.0
	Mol	9.9	10.2	11.0	11.1	7.7	8.0	8.8	8.9	23.6	23.3	22.2	20.8	26.3	26.0	25.0	23.6
C4	Con	9.7	10.1	10.9	11.1	7.6	7.9	8.7	8.9	26.2	26.0	24.5	24.1	28.9	28.7	27.1	26.8
	FA	9.8	10.2	11.0	11.2	7.7	8.0	8.8	9.0	26.3	26.1	24.5	24.1	28.9	28.7	27.2	26.8
	Mol	9.9	10.2	11.1	11.3	7.8	8.1	8.9	9.1	26.8	26.6	25.0	24.7	29.4	29.3	27.7	27.3
		(2017-18)				(2017-18)				(2017-18)				(2017-18)			
C1	Con	9.1	9.5	9.9	10.1	7.9	8.9	9.5	9.8	28.4	28.2	27.5	27.0	31.7	31.6	30.8	30.4
	FA	9.5	9.6	10.0	10.3	8.0	9.0	9.6	9.9	28.4	27.9	27.5	26.8	31.7	31.5	30.8	30.4
	Mol	9.8	10.2	10.6	10.8	8.1	9.1	9.7	10.0	29.0	28.9	28.1	27.6	32.3	32.2	31.4	31.0
C2	Con	8.3	9.4	10.2	11.0	6.7	7.6	8.0	8.3	27.6	26.6	24.8	23.5	30.8	30.0	28.3	27.0
	FA	8.7	9.8	10.6	11.4	7.3	7.7	8.1	8.4	27.7	26.6	24.8	23.5	30.8	30.0	28.3	27.0
	Mol	8.9	10.0	10.9	11.6	7.0	7.6	8.1	8.4	28.1	27.2	25.4	24.1	31.4	30.6	28.8	27.5
C3	Con	11.8	12.2	12.9	13.2	8.6	8.8	9.6	10.0	22.3	21.9	21.7	20.3	24.8	24.5	23.5	22.1
	FA	11.9	12.6	13.3	13.5	8.7	8.9	9.7	9.7	22.3	22.0	21.5	20.4	24.9	24.5	23.5	22.1
	Mol	11.5	12.9	13.6	13.3	8.7	9.0	9.8	9.8	22.9	22.4	21.3	20.0	25.3	25.0	24.0	22.6
C4	Con	9.8	10.6	11.4	12.6	8.6	8.9	9.6	9.9	25.4	24.2	23.6	22.3	28.8	28.6	27.1	26.8
	FA	10.8	11.4	12.3	13.0	8.7	9.0	9.7	10.0	25.4	24.2	23.6	22.8	28.8	28.7	27.1	26.8
	Mol	10.7	11.7	12.1	13.9	8.8	9.1	9.8	10.1	26.0	24.8	24.2	23.7	29.4	29.2	27.6	27.3

N0= 0 kg N.ha<sup>-1</sup>, N1=75 kg N.ha<sup>-1</sup>, N2= 150 kg N.ha<sup>-1</sup> and N3 = 225 kg N.ha<sup>-1</sup>; C1= Barley, C2= Oats, C3= Rye, C4=Triticale, CP= Crude Protein, CF= Crude Fiber; Con= Control, FA= Formic Acid, Mol= Molasses; BS= Booting Stage; MDS= Milking Dough Stage.

N0= 0 kg N.ha<sup>-1</sup>, N1=75 kg N.ha<sup>-1</sup>, N2= 150 kg N.ha<sup>-1</sup> y N3 = 225 kg N.ha<sup>-1</sup>; C1= Cebada, C2= Avena, C3= Centeno, C4=Triticale, CP= Proteína Cruda, CF= Fibra Cruda; Con= Control, FA= Ácido Fórmico, Mol= Melaza; BS= Fase de Arranque; MDS= Etapa de grano lechoso



**Figure 1.** Two years mean booting and milking dough stage association of number of plants, plant height, number of tillers, leaf area, fresh weight plant<sup>-1</sup> and dry weight plant<sup>-1</sup> with green and dry matter yield at Rawalakot, Azad Jammu and Kashmir, Pakistan

**Figura 1.** Dos años promedio para la etapa de arranque y de grano lechoso para la asociación entre el número de plantas, la altura de la planta, el número de tallos, el área foliar, el peso fresco.planta<sup>-1</sup> y el peso seco.planta<sup>-1</sup> con el rendimiento de materia verde y seca en Rawalakot, Azad Jammu y Kashmir, Pakistán

graph was in accordance with Abye *et al.* (2019) who stated that positive correlation was established among growth at harvest and dry matter level of whole crop wheat while this correlation may differ between years, sites and cultivars. Similarly, Kren *et al.* (2015) reported that number of tillers exhibited positive correlation coefficient with dry weight per plant and above ground biomass during vegetative

de la planta de cultivo. Landry *et al.* (2019) informaron que los cultivos de cobertura de cereales de invierno como el trigo, el centeno y el triticale, como forrajes de primavera mostraron un aumento significativo de los valores de PC con el incremento de las tasas de N, mientras que, por otro lado, los contenidos de PC disminuyeron a medida que avanzaba el crecimiento desde la fase de hoja bandera hasta la fase de cabeza. El cultivo de cebada se

stage but it may differ significantly during years due to different climatic conditions. Likewise, Gagnon *et al.* (2019) described that cool season grasses have showed positive quadratic and linear response of nitrogen fertilization for dry matter yield.

## Conclusion

The tested winter forage cereals barley, oats, rye and triticale showed best performance with maximum dose of nitrogen application. Among the entire WFCs, the rye gave higher fodder yield at maximum dose of nitrogen application. Furthermore, for winter season, the rye and triticale are the best options to cover up the lean period of green forage availability. Forages preserved at booting stage with the use of molasses is best to get the good quality of silage.

## Acknowledgement

A part of this manuscript has been extracted from PhD Agronomy thesis of the principal author submitted to the same university.

### *End of English Version*

## Cited literature

- Aby, B. A., Å. T. Randby, H. Bonesmo and L. Aass. 2019. Impact of grass silage quality on greenhouse gas emissions from dairy and beef production. *Grass Forage Sci.* 74(3): 525-534.
- Ahmad, A., A. Wahid, F. Khalidg, N. Fiaz and M. Zamir. 2011. Impact of organic and inorganic sources of nitrogen and phosphorus fertilizers on growth, yield and quality of forage oat (*Avena sativa* L.). *Cercet. agron. Molde.* 44(3): 39-49

situó por delante de los otros cereales en cuanto a fibra cruda, mientras que el valor más bajo de fibra cruda se observó en el cultivo de centeno (Cuadro 3). La fibra cruda disminuye cuando aumenta el nivel de nitrógeno. El ensilaje conservado mediante la adición de melaza permaneció más elevado en el análisis de la fibra cruda durante los dos años y en ambas fases de la cosecha. Los resultados de estos hallazgos coincidieron con Li *et al.* (2016) y Surber *et al.* (2011) quienes confirmaron que con el aumento de la tasa de aplicación de N el contenido de FC del ensilaje del cultivo de trigo entero disminuyó. Además, de acuerdo a Morais *et al.* (2017) el uso de aditivos químicos se justifica para mejorar la estabilidad aeróbica de los ensilados de cereales de alta humedad. El gráfico muestra un aumento lineal del número de plantas con el rendimiento de forraje verde, mostrando una correlación positiva, lo que indica que las plantas más altas tienen el potencial de producir una mayor biomasa.

Además, la asociación entre la altura de la planta y el número de tallos con el rendimiento del forraje verde presentado en la figura 1 también evidenció una correlación lineal positiva entre sí con el rendimiento de forraje fresco, lo que indica la necesidad de mejorar las variedades de forraje, que tengan un mayor potencial para altura de planta y macollas.planta<sup>-1</sup>. La relación individual mostró ser fuertemente positiva mientras que la relación acumulativa con las dosis de nitrógeno mostró una asociación moderada entre las variables.



Los valores de nuestro gráfico de correlación estuvo en conformidad con Aby *et al.* (2019) quienes plantearon que una correlación positiva se estableció entre las etapas de crecimiento a nivel de cosecha con la materia seca de todo el cultivo de trigo, aunque esta correlación puede diferir según los años, sitios y cultivares. Así mismo, Kren *et al.* (2015) reportaron que el número de tallos exhibió un coeficiente de correlación positivo con el peso seco por planta y la biomasa sobre el suelo durante la etapa vegetativa, pero puede diferir significativamente durante los años debido a las diferentes condiciones climáticas. Igualmente, Gagnon *et al.* (2019) describieron que las gramíneas de estación fría han mostrado una respuesta cuadrática y lineal positiva de la fertilización nitrogenada para el rendimiento de materia seca.

## Conclusión

Los cereales forrajeros de invierno evaluados, cebada, avena, centeno y triticale, mostraron el mejor rendimiento con la dosis máxima de aplicación de nitrógeno. Entre todos los cereales forrajeros, el centeno dio un mayor rendimiento forrajero con la dosis máxima de aplicación de nitrógeno. Además, para la temporada de invierno, el centeno y el triticale son las mejores opciones para cubrir el período de escasez de disponibilidad de forraje verde. Los forrajes conservados en la fase de arranque con el uso de melaza son los mejores para obtener una buena calidad de ensilado.

## Agradecimiento

A part of this manuscript has been extracted from PhD Agronomy thesis of the principal author submitted to the same university.

Una parte de este manuscrito se ha extraído de la tesis doctoral en Agronomía del autor principal, presentada en la misma universidad.

Amanullah, R. A. Khattak and S. K. Khalil. 2008. Effects of plant density and N on phenology and yield of cereal. *Plant. Nut. J.* 32: 246-260.

Anwar, A., M. Ansar, M. Nadeem, G. Ahmad, S. Khan and A. Hussain. 2010. Performance of non-traditional winter legumes with oats for forage yield under rainfed conditions. *J. Agric. Res.*48(2): 171-179.

AOAC. 2012. Association of Official Analytical Chemists. Official method of analysis Washington, DC.

Bilal, M., M. Ayub, M. Tariq, M. Tahir and M.A. Nadeem. 2017. Dry matter yield and forage quality traits of oat (*Avena sativa* L.) under integrative use of microbial and synthetic source of nitrogen. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 16(3): 236-241.

Dhillon, B. S., R.S. Uppal and M. Goyal. 2019. Forage quality and productivity of barley (*Hordeum vulgare* L.) as influenced by cutting management under staggered sowing in North-West India. *Arch. Agron. Soil Sci.* 1-15.

Gagnon, B., N. Ziadi, G. Bélanger, G. F. Tremblay and G. Parent. 2019. Urea-based fertilizer as an efficient nitrogen source in perennial cool-grass forage production. *J. Agron.* 111(2): 867-880.

Gangwar, H. K. and M.D. Lodhi. 2018. Effect of Nitrogen Levels and Number of Irrigation on Growth and Yield of Wheat. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 7(3): 3663-3673.

Geiger, R. 1954. Klassifikation der klimate nach W. Köppen. Landolt-Börnstein-

Zahlenwerte und Funktionen aus Physik, Chemie, Astronomie, Geophysik und Technik, 3, 603-607.

- Geren, H. 2014. Dry matter yield and silage quality of some winter cereals harvested at different stages under Mediterranean climate conditions. *Turkish J. Field Crop.* 19(2): 197-202.
- Glamočlija, N., M. Starčević, J. Čirić, D. Šefer, M. Glišić, M.Z. Baltić, R. Marković, M. Spasić, and Đ. Glamočlija. 2018. The importance of triticale in animal nutrition. *Veterinary Journal of Republic of Srpska.* 18(1): 84-94.
- Govt. of Pakistan. 2018. Economic Survey of Pakistan, 2017-18. Ministry of Food, Agriculture and Livestock, Agriculture & Livestock Division (Economic Wing), Government of Pakistan, Islamabad. Chapter 2, Agriculture: Pp. 1-20.
- Iqbal, M. F., M. A. Sufyan, M. M. Aziz, I. A. Zahid, Qamir-ul-Ghani and S. Aslam. 2009. Efficacy of nitrogen on green fodder yield and quality of oat (*Avena sativa* L.). *JAPS.* 19 (2): 82-84.
- Khaliq, A. and M.K. Abbasi. 2015. Improvements in the physical and chemical characteristics of degraded soils supplemented with organic-inorganic amendments in the Himalayan region of Kashmir, Pakistan. *Catena*, 126: 209-219.
- Khan, A., M.H. Anjum, M.K.U. Rehman, Q. Zaman and R. Ullah. 2014. Comparative study on quantitative and qualitative characters of different oat (*Avena sativa* L.) genotypes under agro-climatic conditions of sargodha, pakistan. *Amj. J. Plant Sci.* 5(20): 3097.
- Kim, K.S., J.D. Anderson, S. L. Webb, M.A. Newell and T.J. Butler. 2017. Variation in winter forage production of four small grain species-oat, rye, triticale, and wheat. *Pak. J. Bot.* 49(2): 553-559.
- Kren, J., K. Klem, I. Svobodová, P. Miša and L. Neudert. 2015. Yield and grain quality of spring barley as affected by biomass formation at early growth stages. *Plant Soil Environ.* 60(5): 221-227.
- Landry, E., K. Janovicek, E.A. Lee and W. Deen. 2019. Winter cereal cover crops for spring forage in temperate climates. *J. Agron.* 111(1): 217-223.
- Lekgari, A. L., P.S. Baenziger, K. P. Vogel and D.D. Baltensperger. 2008. Identifying winter forage triticale (x *Triticosecale* Wittmack) strains for the Central Great Plains. *Crop Sci.* 48: 2040-2048.
- Li, C., Z. Xu, Z. Dong, S. Shi and J. Zhang. 2016. Effects of nitrogen application rate on the yields, nutritive value and silage fermentation quality of whole-crop wheat. *Asian-Australasian J. Animal Sci.* 29(8): 1129.
- Malik, P., L.K. Midha, S. Arya and U.N. Joshi. 2015. Effect of cutting and fertility levels on quality of oat. *Forage Res.* 40: 257-258.
- Morais, G., J. Daniel, C. Kleinshmitt, P. Carvalho, J. Fernandes, and L. Nussio. 2017. Additives for grain silages: A review. *Slovak J. Anim.* 50(1): 42-54.
- Mut, Z., H. Akay and Ö Erbaş. 2015. Hay yield and quality of oat (*Avena sativa* L.) genotypes of worldwide origin. *Int. J. Plant Prod.* 9(4): 507-522.
- Mut, Z., I. Ayan and H. Mut. 2006. Evaluation of forage yield and quality at two phenological stages of triticale genotypes and other cereals grown under rainfed conditions. *Bangladesh J. Bot.* 35(1): 45-53.
- Obour, A., J. Holman and A. Schlegel. 2018. Seeding rate and nitrogen application effects on spring oat and triticale forage. *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports.* 4(5), P.5.
- Ronga, D., A. Dal Prà, A. Immovilli, F. Ruoizzi, R. Davolio and M.T. Pacchioli. 2020. Effects of Harvest Time on the Yield and Quality of Winter Wheat Hay Produced in Northern Italy. *Agronomy.* 10(6): 917.
- Steel, R.G.D., J.H. Torrie and D.A. Dickey. 1997. Principles and procedures of statistics: A Biometrical approach. 3rd ed. McGraw Hill Book Co. New York. pp. 400-428.




- Surber, L., H. Abdel-Haleem, J. Martin, P. Hensleigh, D. Cash and J. Bowman. 2011. Mapping quantitative trait loci controlling variation in forage quality traits in barley. *Mol. Breed.* 28(2): 189-200.
- Tawfiq, S. H. E. and S. R. Muhammed. 2014. Response of Three Cereal Crops to Different Clipping Times for Forage Yield at two Locations of Sulaimani Region J. Zankoy Sulaimani.
- Worku, M., M. Bänziger, D. Friesen and W.J. Horst. 2007. Nitrogen uptake and utilization in contrasting nitrogen efficient tropical maize hybrids. *Crop Sci.* 47(2): 519-528.
- Zafar, M., M.K. Abbasi and A. Khaliq. 2013. Effect of different phosphorus sources on the growth, yield, energy content and phosphorus utilization efficiency in maize at Rawalakot Azad Jammu and Kashmir, Pakistan. *J. Plant Nut.* 36 (12): 1915-1934.
- Zhang, H., X. Yu, Z. Jin, W. Zheng, B. Zhai and Z. Li. 2017. Improving grain yield and water use efficiency of winter wheat through a combination of manure and chemical nitrogen fertilizer on the Loess plateau, China. *J. soil Sci. Plant Nutr.* 17(2): 461-474.

## ***Antagonismo de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre aislados de *Fusarium* spp. procedentes de *Nicotiana tabacum****

Antagonism of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* on isolates of *Fusarium* spp. from *Nicotiana tabacum*

Antagonismo de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride* em isolados de *Fusarium* spp. de *Nicotiana tabacum*

Wilson Geobel Ceiro-Catasú<sup>1\*</sup>, Yusel Vega-González<sup>1</sup>, María Eulalia Taco-Sánchez<sup>2</sup>, Ramiro Remigio Gaibor-Fernández<sup>3</sup>, Oandis Sosa-Sánchez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, Cuba. Carretera a Manzanillo Km 17<sup>1/2</sup> Peralejo - Apartado 21 - Bayamo M. N. CP 85100. Correo electrónico: (WC) [wceiroc@gmail.com](mailto:wceiroc@gmail.com),  (OS) [oandis.sosa@gmail.com](mailto:oandis.sosa@gmail.com), . <sup>2</sup>Empresa JATUNCUY, Ecuador. Provincia Cotopaxi. Correo electrónico: [eulaliataco@gmail.com](mailto:eulaliataco@gmail.com), .

<sup>3</sup>Docente de la Carrera de Agronomía, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. Ave. Carlos J. Arosemena 38, Quevedo, Ecuador. Correo electrónico: [rgaibor@uteq.edu.ec](mailto:rgaibor@uteq.edu.ec),

.

### **Resumen**

La producción tabacalera es un renglón fundamental en la economía cubana y genera el mayor ingreso en el sector agrícola. Dentro de los fitopatógenos que afectan a esta planta, *Fusarium* spp., constituye una plaga de interés, debido a las afectaciones vasculares que provocan deterioro del valor comercial de la hoja. Por tanto, la investigación se realizó con el objetivo de determinar la actividad antagonista *in vitro* de cepas autóctonas de *Trichoderma harzianum* y *T. viride* sobre aislados de *Fusarium oxysporum* y *F. phyllophylum*, procedentes de *Nicotiana tabacum* L. en la provincia Granma, Cuba. El trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola, Universidad de Granma. Se preparó medio agar papa dextrosa para establecer los cultivos duales de *Trichoderma* spp. vs. *Fusarium* spp. Una vez establecidos los tratamientos y transcurrido el

Recibido: 07-12-2020 • Aceptado: 22-02-2021

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [wceiroc@gmail.com](mailto:wceiroc@gmail.com)

tiempo de incubación se procedió a determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, la capacidad antagonica y la actividad micoparasítica. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cuatro réplicas por tratamiento y para el procesamiento estadístico se usó un ANOVA bifactorial y la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Se evidenció que las cepas de *Trichoderma* spp., registraron valores intermedios de inhibición del hongo, la competitividad del antagonista se ubicó mayoritariamente en la clase dos de la escala de Bell y se constató que, penetración, enrollamiento, vacuolización, deformación y granulación constituyen las principales formas de micoparasitismo. Lo cual señala a este método de biocontrol como una alternativa a tener en cuenta para el manejo de *Fusarium* spp., en agroecosistemas tabacaleros.

**Palabras clave:** *Trichoderma* spp., antagonismo, antibiosis, micoparasitismo, tabaco, fusariosis.

### Abstract

Tobacco production is a key line in the Cuban economy and generates the largest income in the agricultural sector. Within phytopathogens affecting this plant, *Fusarium* spp., constitutes a pest of interest, due to vascular involvements that cause deterioration of the commercial value of the leaf. Therefore, the research was carried out with the aim of determining the antagonistic activity *in vitro* of native strains of *Trichoderma harzianum* and *T. viride* on isolates of *Fusarium oxysporum* and *F. phyllophylum*, from *Nicotiana tabacum* L. in Granma province, Cuba. The work was carried out at the Laboratory of Agricultural Microbiology, University of Granma. Half dextrose potato agar was prepared to establish the dual crops of *Trichoderma* spp. vs. *Fusarium* spp. Once the treatments were established and the incubation time had elapsed, the percentage inhibition of mycelial growth, antagonistic capacity and mycoparasitic activity was determined. A fully randomized design with four replicas per treatment was used and a two factorial ANOVA and Tukey test ( $p \leq 0.05$ ) were used for statistical processing. It was shown that the strains of *Trichoderma* spp., recorded intermediate values of phytopathogenic inhibition, the competitiveness of the antagonist was mostly located in class two of the Bell scale and it was found that penetration, winding, vacuolization, deformation and granulation constitute the main forms of mycoparasitism. Which points to this biocontrol method as an alternative to consider for the management of *Fusarium* spp., in tobacco agroecosystems.

**Key words:** *Trichoderma* spp., antagonism, antibiosis, mycoparasitism, tobacco, fusariosis.

### Resumo

A produção de tabaco é uma linha-chave na economia cubana e gera o maior rendimento do sector agrícola. Dentro dos fitopógenos que afetam esta planta, a *Fusarium* spp., constitui uma praga de interesse, devido a envolvimento

vasculares que causam a deterioração do valor comercial da folha. Por conseguinte, a investigação foi realizada com o objetivo de determinar a atividade antagónica *in vitro* de estirpes nativas de *Trichoderma harzianum* e *T. viride* em isolados de *Fusarium oxysporum* e *F. phyllophylum*, de *Nicotiana tabacum* L. na província de Granma, Cuba. O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Agrícola da Universidade de Granma. Metade dextrose batata agar estava preparado para estabelecer as duplas culturas de *Trichoderma* spp. vs. *Fusarium* spp. Uma vez estabelecidos os tratamentos e decorrido o tempo de incubação, foi determinada a percentagem de inibição do crescimento micémico, da capacidade antagónica e da atividade micoparasitótica. Foi utilizado um desenho totalmente aleatório com quatro réplicas por tratamento e um teste de ANOVA e Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para processamento estatístico. Foi demonstrado que as estirpes de *Trichoderma* spp., registaram valores intermédios de inibição fitopogénica, a competitividade do antagonista situava-se principalmente na classe dois da escala de Sino e verificou-se que a penetração, o enrolamento, a vacuolização, a deformação e a granulação constituem as principais formas de micoparasitose. O que aponta este método de biocontrolo como uma alternativa a considerar para a gestão da *Fusarium* spp., nos agroecossistemas de tabaco.

**Palavras-chave:** *Trichoderma* spp., antagonismo, antibiose, micoparasitismo, tabaco, fusariose.

## Introducción

La provincia Granma es un territorio eminentemente agropecuario ubicado al este de Cuba, donde se establecen diferentes cultivos de interés económico como caña azúcar, arroz, café, pastos, tabaco, entre otros. En el caso específico del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), una parte considerable de sus producciones se destinan a la fabricación y la exportación del puro cubano, reconocido internacionalmente por su excelente calidad. No obstante, esta planta puede ser afectada por diferentes organismos plagas, entre ellos destacan los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* Schltdl. y *F. phyllophylum* Nirenberg & O'Donnell, causante de infecciones vasculares que afectan el valor comercial del tabaco, el cual radica en la calidad de

## Introduction

The province of Granma is an eminently agricultural territory located in the east of Cuba, where different crops of economic interest are established such as, sugar cane, rice, coffee, pastures, and tobacco, among others. In the specific case of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.), a considerable part of its productions are destined to the manufacture and the exportation of Cuban cigars, internationally recognized for their excellent quality. However, this plant can be affected by different pest organisms, among them the phytopathogenic *Fusarium oxysporum* Schltdl. and *F. phyllophylum* Nirenberg & O'Donnell, which cause vascular infections that affect the commercial value of tobacco, which depends on the quality of its

sus hojas y por tanto, todo aquello que las afecte es importante investigarlo y ofrecerle una solución localmente viable (Berruezo *et al.*, 2018).

*Fusarium* spp., posee una amplia distribución, su presencia es cosmopolita y sobrevive saprófitamente en el suelo, aire, agua y diversos sustratos. Muchas especies tienen una gran capacidad para infectar a las plantas de interés económico y ciertos biotipos pueden causar infecciones oportunistas a los animales y al hombre, atribuidas fundamentalmente por la producción de micotoxinas (Chiotta *et al.*, 2015). Debido a las estructuras de resistencia que posee, denominadas clamidosporas, persisten largos periodos de tiempo en el suelo, lo cual hace inefectiva la alternativa de manejo basada en la rotación de cultivos (Delgado-Ortiz *et al.*, 2016). *F. oxysporum* es un organismo muy polífago a nivel de especie, se cuantificaron más de 120 formas especiales, las cuales se basan en la infección que produce sobre la planta hospedera. Dichas formas a su vez se subdividen en razas, las que se describen según la habilidad para infectar diferentes variedades de una misma especie (Retana *et al.*, 2018).

Para el manejo del marchitamiento vascular del tabaco se recomienda el biocontrol como una medida que no afecta el ambiente. En este sentido, las especies del género *Trichoderma* destacan como las más utilizadas. Las mismas presentan diferentes mecanismos de acción, entre ellos, la competencia, la antibiosis, el micoparasitismo y la activación de mecanismos de defensa en las plantas.

leaves and therefore, everything that affects them is important to investigate and offer a locally viable solution (Berruezo *et al.*, 2018).

*Fusarium* spp., possess a wide distribution, its presence is cosmopolitan and survives saprophytically in soil, air, water and various substrates. Several species have a big capacity to infect the plants of economic interest and certain biotypes can cause opportunistic infections to the animals and human being, mainly attributed by the production of mycotoxins (Chiotta *et al.*, 2015). Due to the structures of the resistance that it has, denominated chlamydo spores, they persist for long periods of time in the soil, which makes ineffective the management alternative based on the crops rotations (Delgado-Ortiz *et al.*, 2016). *F. oxysporum* is a very polyphagous organism at specie level; 120 special forms were quantified, which are based on the infection that it produces on the host plant. These forms are subdivided into races, which are described according to the ability to infect different varieties of the same specie (Retana *et al.*, 2018).

For the management of tobacco vascular wilt, the biocontrol is recommended as a measurement that does not affect the environment. In this sense, the species of the genus *Trichoderma* highlight as the most used. They present different mechanisms of action, among them, the competition, the antibiosis, the mycoparasitism, and the activation of defense mechanisms in the plants. It is known that the higher is the probability of *Trichoderma*

Se conoce que mientras mayor sea la probabilidad de que *Trichoderma* spp., manifieste varios modos de acción; más eficiente y duradero será el efecto de biocontrol sobre el fitopatógeno (Infante *et al.*, 2009; Cruz-Triana *et al.*, 2017). Las especies de *Trichoderma* actúan por medio de una combinación de competencia por nutrientes, la producción de metabolitos antifúngicos, la síntesis de enzimas hidrolíticas y el micoparasitismo, así como, pueden inducir la estimulación del crecimiento vegetal (Carvajal *et al.*, 2015). Como hongo saprófito del suelo tiene la característica de fácil multiplicación y rápido crecimiento en condiciones controladas, lo cual favorece su utilización como biofungicida (Rivera *et al.*, 2016). Los productos basados en este hongo comprenden más de 50 formulaciones, algunas disponibles como productos comerciales en el mercado (Gato, 2010). Sin embargo, no se constataron estudios sobre el manejo de *Fusarium* spp., con cepas nativas de *T. harzianum* y *T. viride* en tabaco, lo cual sería novedoso investigar para el biocontrol local de este hongo.

Teniendo en cuenta lo expuesto, se propuso como objetivo de esta investigación determinar la actividad antagónica *in vitro* de cepas autóctonas de *Trichoderma harzianum* y *T. viride* sobre aislados de *Fusarium* spp., procedentes de *N. tabacum* en la provincia Granma.

## Materiales y métodos

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias

spp., manifiests various modes of action; the effect of biocontrol on the phytopathogen is more efficient and durable (Infante *et al.*, 2009; Cruz-Triana *et al.*, 2017). The species of *Trichoderma* act through a combination of competence for nutrients, the production of antifungals metabolites, the synthesis of hydrolytic enzymes and mycoparasitism, as well as, they can induce plant growth stimulation (Carvajal *et al.*, 2015). As saprophytic soil fungus, it has the characteristic of easy multiplication and rapid growth under controlled conditions, which favors its use as a biofungicide (Rivera *et al.*, 2016). The products based on this fungus include more than 50 formulations, some of them available as commercial products in the market (Gato, 2010). However, there were not studies on the management of *Fusarium* spp. with native strains of *T. harzianum* and *T. viride* in tobacco were found, which would be novel to investigate for the local biocontrol of this fungus.

Considering the above, it was proposed as the objective of this research to determine the *in vitro* antagonistic activity of autochthonous strains of *Trichoderma harzianum* and *T. viride* on *Fusarium* spp. isolates from *N. tabacum* in Granma province.

## Materials and methods

The research was carried out at the Agricultural Microbiology Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences, University of Granma, Cuba. Potato dextrose agar medium was prepared with antibiotic (PDA BioCen: 39 g.L<sup>-1</sup>



Agropecuarias, Universidad de Granma, Cuba. Se preparó medio agar papa dextrosa con antibiótico [PDA BioCen: 39 g.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O destilada, más cloranfenicol, tetraciclina y estreptomycin (50 mg.L<sup>-1</sup>) en matraces Erlenmeyer y pH ajustado a 6]. El medio se esterilizó y se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de 36 °C y se vertió en placas Petri de 80 mm de diámetro. Una vez solidificado, se procedió a establecer el enfrentamiento en cultivo dual (CD) según la metodología descrita por Bell *et al.* (1982).

Las cepas autóctonas A-53, A-34 de *Trichoderma harzianum* y TS-3 de *T. viride* fueron proporcionadas por el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal (LAPROSAV-Granma), las mismas fueron aisladas de cultivos hortícolas agroecológicos en la región este de Cuba y los aislamientos nativos de *Fusarium* spp. (cuadro 1) se obtuvieron del cultivo de tabaco (secciones de tallos) en áreas de producción comercial de esta planta, estos permanecían conservados en la colección de fitopatógenos del Laboratorio de Microbiología Agrícola, Universidad de Granma.

En las placas Petri con PDA se depositó en un extremo de la misma un disco de cinco mm de diámetro con micelio activo de colonias de *Fusarium* spp. (cuadro 1) y en el otro extremo se colocó un disco con las cepas de *Trichoderma harzianum* y *T. viride*, ambas tenían 72 h de crecidas. Luego las placas fueron selladas con parafilm y se incubaron a 28±2 °C, con intervalos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (Fernández y Suárez, 2009).

of distilled H<sub>2</sub>O, plus chloramphenicol, tetracycline and streptomycin (50 mg.L<sup>-1</sup>) in Erlenmeyer flasks and pH adjusted to 6]. The medium was sterilized and left to cool to a temperature of 36 °C and poured into 80 mm diameter Petri dishes. Once solidified, the cooling dual culture (DC) was established according to the methodology described by Bell *et al.* (1982).

The A-53, A-34 autochthonous strains of *Trichoderma harzianum* and the TS-3 of *T. viride* were provided by the Provincial Laboratory of Plant Health (LAPROSAV-Granma), these were isolated from agroecological horticultural crops in the eastern region of Cuba and the native isolates of *Fusarium* spp. (Table 1) were obtained from tobacco cultivation (stem sections) in areas of commercial production of this plant, these remained preserved in the collection of phytopathogens of the Laboratory of Agricultural Microbiology, University of Granma.

In the Petri dishes with PDA, a disc of five mm of diameter with active mycelium of *Fusarium* spp. colonies was deposited at one end (Table 1) and at the other end a dish with *Trichoderma harzianum* and *T. viride* strains was placed; both had 72 h of growth. Then the dishes were sealed with parafilm and incubated at 28±2 °C, with intervals of 12 h of light and 12 h of darkness (Fernandez and Suarez, 2009).

The inhibition percentage of radial growth (PICR) was evaluated at 24, 72 and 168 h, using the formula  $PICR = [(R1-R2)/R1] \times 100$ ,

**Cuadro 1. Procedencia de los aislados de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium phyllophilum* obtenidos de tallos en cultivo de tabaco (*Nicotiana tabacum*) en la provincia Granma, Cuba.**

**Table 1. Origin of the isolates of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium phyllophilum* obtained from stems in tobacco cultivation (*Nicotiana tabacum*) in Granma province, Cuba.**

Cepa	Localidad/Municipio	Cultivar	Coordenadas	Especies
A	Bueycito/Buey Arriba	SS-96	20°14'20.5"N 76°46'28.8"W	<i>F. oxysporum</i>
B	Bueycito/Buey Arriba	SS-96	20°14'11.4"N 76°46'27.4"W	<i>F. oxysporum</i>
C	Monjará/Guisa	Habana-92	20°17'51.9"N 76°36'08.7"W	<i>F. oxysporum</i>
D	Monjará/Guisa	Corojo-2006	20°18'07.3"N 76°36'42.6"W	<i>F. oxysporum</i>
E	El Dorado/Bayamo	SS-96	20°15'52.3"N 76°44'43.8"W	<i>F. phyllophilum</i>
F	El Dorado/Bayamo	Habana-92	20°15'55.7"N 76°44'35.8"W	<i>F. phyllophilum</i>
G	Corojito/Buey Arriba	Habana-92	20°11'05.2"N 76°43'21.7"W	<i>F. phyllophilum</i>
H	Santa Rita/Jiguani	Habana-92	20°20'11.9"N 76°29'24.1"W	<i>F. oxysporum</i>
I	Los Cayos/Yara	Habana-2000	20°18'20.2"N 76°50'00.6"W	<i>F. phyllophilum</i>

Se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) a las 24, 72 y 168 h, empleándose para ello la fórmula  $PICR = [(R1-R2)/R1] \times 100$ , donde R1 es el crecimiento radial del patógeno (testigo) y R2 el crecimiento radial del patógeno en CD (Esquivel *et al.*, 2019). Se consideró como el efecto antibiosis el PICR a las 24 h, momento en el cual los hongos no interactuaban físicamente. Al séptimo día se registró el antagonismo sobre el fitopatógeno, según la escala de capacidad antagonista de Bell *et al.* (1982), donde Clase 1: *Trichoderma* crece completamente sobre el medio

where R1 is the radial growth of the pathogen (control) and R2 the radial growth of the pathogen in CD (Esquivel *et al.*, 2019). The antibiosis effect was considered as the PICR at 24 h, at which time the fungi were not physically interacting. On the seventh day, antagonism on the phytopathogen was recorded, according to the antagonistic capacity scale of Bell *et al.* (1982), where Class 1: *Trichoderma* grows completely on the culture medium and the pathogen. Class 2: *Trichoderma* reaches 2/3 of the surface of the culture medium. Class 3: *Trichoderma* and the pathogen colonize half of the surface of the

de cultivo y el patógeno. Clase 2: *Trichoderma* alcanza 2/3 de la superficie del medio de cultivo. Clase 3: *Trichoderma* y el patógeno colonizan la mitad de la superficie del medio y ninguno de ellos domina sobre el otro. Clase 4: El organismo patógeno coloniza al menos 2/3 de la superficie del medio. Clase 5: El patógeno crece por encima del aislado de *Trichoderma* y ocupa casi toda la superficie del medio.

La actividad micoparasítica se determinó a partir del momento de la interacción física entre los hongos (antagonista vs. patógeno) en CD, entre las 72-96 h. para ello, se tomaron tres muestras por cada tratamiento del sitio de contacto y se observaron al microscopio óptico marca Novel, modelo N 200 M con cámara digital acoplada HDCE-X3, de este modo se evidenció el tipo de interacción hifal (penetración, enrollamiento, vacuolización, deformación y granulación).

Se utilizó un diseño completamente al azar con 27 tratamientos conformados a partir de la combinación de las tres cepas de *Trichoderma*, A-53 y A-34 (*T. harzianum*) y TS-3 (*T. viridae*) y nueve aislados de *Fusarium* (A, B, C, D, E, F, G, H, I), con cuatro réplicas por cada tratamiento, así como, los correspondientes controles del antagonista y fitopatógeno sin interactuar entre sí. Para el procesamiento estadístico se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) bifactorial y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), procesado con

medium and none of them dominates over the other. Class 4: The pathogen colonizes at least 2/3 of the surface of the medium. Class 5: The pathogen grows above the *Trichoderma* isolate and occupies almost all the surface of the medium.

The mycoparasitic activity was determined from the moment of physical interaction between fungi (antagonist vs pathogen) in CD, between 72-96 h. for that, three samples were taken for each treatment from the contact site and were observed under a Novel optical microscope, model N 200 M with HDCE-X3 coupled digital camera, in this sense the type of hyphal interaction (penetration, winding, vacuolization, deformation and granulation) was evidenced.

A completely randomized design was used with 27 treatments conformed from the combination of three strains of *Trichoderma*, A-53 and A-34 (*T. harzianum*) and TS-3 (*T. viridae*) and nine isolates of *Fusarium* (A, B, C, D, E, F, G, H, I), with four replicas by each treatment, as well as, the corresponding controls of the antagonist and phytopathogen without interacting with each other. For the statistical processing a bifactorial analysis of variance (ANOVA) and the Tukey's multiple comparison means test ( $p \leq 0.05$ ) were used, processed with the STATISTIC 2008 (StatSoft, 2007) statistical package. Prior to ANOVA the data expressed in percentage were transformed by  $2 * [\text{RAÍZ}(X/100)]$ , due to the same did not complied with the normality test.

el paquete estadístico STATISTIC 2008 (StatSoft, 2007). Previo al ANOVA los datos expresados en porcentaje fueron transformados por  $2^*[\text{RAÍZ}(X/100)]$ , debido a que los mismos no cumplieron con la prueba de normalidad.

## Resultados y discusión

Al analizar la interacción entre las cepas se evidenciaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0,05$ ) para la variable PICR a las 24, 72 y 168 h de confrontación. A las 24 h, el rango de inhibición osciló entre 0,00 y 65,08 %, luego a las 72 h se registraron valores entre 1,25 y 136,79 % y finalmente a las 168 h se observó una inhibición intermedia de 40,96 a 57,22 %; donde el 59,25 % de las interacciones antagonista vs. fitopatógeno registraron un PICR superior a 50 %. Momento en el cual, las cepas de *Trichoderma* spp., estabilizaron su efecto de biocontrol sobre el hongo (cuadro 2). Lo expuesto, se atribuye a una menor variabilidad del efecto de biocontrol del antagonista, así como, a una cantidad mayor de interacciones con valores intermedios de PICR, posibilitando de este modo, un mayor crecimiento sobre las placas Petri de *T. harzianum* y *T. viride* en comparación con el fitopatógeno. Lo cual se relaciona con lo observado por Hoyos *et al.* (2019), donde *Trichoderma* spp. logró el mayor crecimiento *in vitro* sobre *F. oxysporum* aislado de *Capsicum annuum* L.

## Results and discussion

When analyzing the interaction between the strains, significant differences between treatments ( $p \leq 0.05$ ) were observed for the variable PICR at 24, 72 and 168 h of confrontation. At 24 h, the range of inhibition oscillated between 0.00 and 65.08 %, then at 72 h values between 1.25 and 136.79 % were recorded and finally at 168 h an intermediate inhibition of 40.96 to 57.22 % was observed; where 59.25 % of the antagonist vs. phytopathogen interactions registered a PICR higher than 50 %. Moment in which, the strains of *Trichoderma* spp. stabilized their effect of biocontrol on the fungus (table 2). The above is attributed to a lower variability of the biocontrol effect of the antagonist, as well as, to a greater quantity of interactions with intermediate values of PICR, making possible in this way, a greater growth on the Petri dishes of *T. harzianum* and *T. viride* in comparison with the phytopathogen. Which is related to what was observed by Hoyos *et al.* (2019), where *Trichoderma* spp. achieved the greatest *in vitro* growth on *F. oxysporum* isolated from *Capsicum annuum* L.

Suárez *et al.* (2008) demonstrated that the antagonism of *T. harzianum* against *F. solani*, associated with the wilt of *Passiflora edulis* Sims, at 240 h of confrontation in CD presented inhibition greater than 50 %. This result surpassed some of the treatments evaluated in the present investigation, which could be due to differences in the origin of the

**Cuadro 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de los aislados de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium phyllophilum* evaluados en cultivos duales con las cepas A-34, A-53 y TS-3 de *Trichoderma* spp.**

**Table 2. Percentage of radial growth inhibition (PICR) of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium phyllophilum* isolates evaluated in dual cultures with *Trichoderma* spp strains A-34, A-53 and TS-3.**

<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	PICR 24h (%)	PICR 72h (%)	PICR 168h (%)
A-53		40,00 bcde	42,63 defgh	53,89 abc
A-34	A	40,00 bcde	15,03 abcde	52,50 abc
TS-3		44,44 bcde	15,05 abcdef	50,00 abc
A-53		14,58 abcde	34,04 bcdefg	49,44 abc
A-34	B	18,75 abcde	29,42 cdefgh	57,22 c
TS-3		12,50 abcde	10,84 abcde	49,72 abc
A-53		57,14 de	55,62 fgghi	53,89 abc
A-34	C	65,08 e	70,77 ghij	54,44 abc
TS-3		57,14 de	44,56 fgghi	56,39 c
A-53		0,00 a	18,52 abcdef	46,94 abc
A-34	D	9,09 abcd	15,56 abcdef	52,50 abc
TS-3		3,03 ab	18,52 abcdef	49,17 abc
A-53		35,90 bcde	22,77 abcdefg	40,96 a
A-34	H	35,90 bcde	2,74 ab	52,71 abc
TS-3		35,90 bcde	2,82 abc	40,96 a
A-53		41,18 cde	57,12 fgghi	45,56 abc
A-34	E	37,25 bcde	85,88 ij	55,28 bc
TS-3		31,37 bcde	105,77 j	56,39 c
A-53		0,00 a	16,50 abcdef	43,89 abc
A-34	F	60,00 de	30,04 defgh	54,17 abc
TS-3		0,00 a	18,18 abcdef	50,56 abc
A-53		0,00 a	1,25 a	43,06 abc
A-34	G	5,56 abc	15,24 abcde	55,00 abc
TS-3		8,33 abc	6,42 abcde	48,89 abc
A-53		35,90 bcde	10,52 efgh	43,89 abc
A-34	I	25,54 abcde	38,13 defgh	55,28 bc
TS-3		61,54 de	136,79 j	54,44 abc
EE <sup>2</sup>	-	0,12	0,22	0,17

*Trichoderma* spp.: *T. harzianum* (A-53 y A-34) y *T. viride* (TS 3). *Fusarium* spp.: *F. oxysporum* (A, B, C, D, H) y *F. phyllophilum* (E, F, G, I). <sup>2</sup>: error estándar. Letras diferentes en las columnas señalan diferencias significativas (Tukey, p<0,05).

*Trichoderma* spp.: *T. harzianum* (A-53 and A-34) and *T. viride* (TS 3). *Fusarium* spp.: *F. oxysporum* (A, B, C, D, H) and *F. phyllophilum* (E, F, G, I). <sup>2</sup>: standard error. Different letters in the columns indicate significant differences (Tukey, p<0.05).

Suárez *et al.* (2008) demostraron que el antagonismo de *T. harzianum* frente *F. solani*, asociado a la marchitez de *Passiflora edulis* Sims, a las 240 h de enfrentados en CD presentó inhibición mayor al 50 %. Dicho resultado superó algunos de los tratamientos evaluados en la presente investigación, lo que pudo estar dado por diferencias en cuanto a la procedencia de las cepas del antagonista, a la virulencia de estas, así como, por la poca cantidad de cepas evaluadas y el tiempo de duración del ensayo, entre otras.

Por otra parte, García (2016) al realizar una evaluación del antagonismo de cepas de *T. harzianum* y *T. viride*, frente a *F. oxysporum* y *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes, aislados de *Aloe vera* (L.) Burm y *Vaccinium corymbosum* L., observó un porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium* spp., de 72 % y 59 % en *C. coccodes*, superando lo alcanzado en este estudio. Mientras que, Vargas *et al.* (2012) evidenciaron que especies de *Trichoderma* pueden alcanzar PICR superior al 80% frente a aislados de *Rhizoctonia* sp. y *Colletotrichum* sp., evidenciándose un alto nivel de fitopatogenicidad del antagonista sobre las dos especies fúngicas analizadas. Recientemente Pérez *et al.* (2017) informaron que, *T. harzianum* cepa A-34 evaluada en este ensayo, alcanzó a las 120 h un 100 % de inhibición del crecimiento micelial del tizón del arroz (*Pyricularia grisea* Sacc), lo cual se consideró como una acción hiperparasita de esta cepa sobre el fitopatógeno.

antagonist strains, their virulence, as well as the small number of strains evaluated and the duration of the trial, among others.

On the other hand, García (2016) when carrying out an evaluation of the antagonism of *T. harzianum* strains and *T. viride*, against *F. oxysporum* and *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes, isolates of *Aloe vera* (L.) Burm and *Vaccinium corymbosum* L., a growth inhibition percentage of *Fusarium* spp., of 72 % and 59 % was observed in *C. coccodes*, exceeding what was achieved in this study. While, Vargas *et al.* (2012) evidenced that the species of *Trichoderma* can reach a PICR higher than 80% compared to the isolates of *Rhizoctonia* sp. and *Colletotrichum* sp., evidencing a high level of phytopathogenicity of the antagonist on the two fungal species tested.

Recently Pérez *et al.* (2017) reported that the strain A-34 of *T. harzianum* evaluated in this assay, reached at 120 h 100% mycelial growth inhibition of rice blight (*Pyricularia grisea* Sacc), which was considered as a hyperparasitic action of this strain on the phytopathogen.

This variability of results, in relation to the antibiosis effect of different evaluated strains of *Trichoderma* in previous researches such as those carried out by Mendoza *et al.* (2015), Hernández *et al.* (2016) and Ronnie-Gakegne *et al.* (2018), highlights that the PICR is a variable indicator and it can depend on different factors, such as, the phytopathogenic specie and the crop where it was isolated, the antagonist and its virulence, the

Esta variabilidad de resultados, con relación al efecto de antibiosis de diferentes cepas de *Trichoderma* evaluadas en investigaciones anteriores como las realizadas por Mendoza *et al.* (2015), Hernández *et al.* (2016) y Ronnie-Gakegne *et al.* (2018), pone de manifiesto que el PICR es un indicador variable y el mismo puede depender de diferentes factores, entre los que destacan, la especie fitopatógena y el cultivo donde fue aislada, el antagonista y su virulencia, el proceso de incubación y la duración del ensayo. Así mismo, es importante destacar que no se encontraron trabajos publicados que abordaran el antagonismo de *Trichoderma* spp., sobre *Fusarium* spp., procedente de *N. tabacum*, lo que sustenta la novedad de estos resultados.

Al analizar el efecto de antibiosis (PICR 24 h) se observó variabilidad en las interacciones antagonista vs. fitopatógeno. Los valores de este indicador oscilaron en un rango de 0-65 %. Un 70,37 % de las interacciones registraron valores de antibiosis por encima del 10 %, a excepción de A-53 x G, D y F, A-34 x G y D y TS-3 x F, G y D (figura 1).

El resultado expuesto posee similitud con lo informado por Cruz-Triana *et al.* (2017), dichos autores registraron variabilidad entre 5-80 % de la antibiosis por efecto del antagonista *T. asperellum* Samuels sobre patógenos fúngicos que afectan a *Glycine max* (L.). Por su parte Sánchez *et al.* (2017) dieron a conocer que el efecto antibiosis es la síntesis de sustancias con actividad antifúngica, previo al contacto físico entre los hongos.

incubation process and the duration of the trial. Likewise, it is important to emphasize that there were not found published works that approached the antagonism of *Trichoderma* spp. on *Fusarium* spp. from *N. tabacum*, which sustains the novelty of these results.

When analyzing the antibiosis effect (PICR24h) variability in this antagonist interaction vs phytopathogen was observed. The values of this indicator oscillated in a range of 0-65 %. A 70.37 % of the interactions registered values of antibiosis above 10 %, with the exception of A-53 x G, D and F, A-34 x G and D and TS-3 x F, G and D (figure 1).

The exposed result is similar to that reported by Cruz-Triana *et al.* (2017), these authors recorded variability between 5-80 % of antibiosis due to the effect of the antagonist *T. asperellum* Samuels on the fungal pathogens that affect to *Glycine max* (L.). For their part Sánchez *et al.* (2017) reported that the antibiosis effect is the synthesis of substances with antifungal activity, prior to the physical contact between the fungi.

Under the experimental conditions evaluated, in the first 24 h the isolates of F, G and D of the phytopathogen were the least inhibited by A-53 (*T. harzianum*) and TS-3 (*T. viride*), which noted that the said strains did not achieve an effective antibiosis at this moment. Showing that, in the first hours of interaction, the fungus can defend itself from the effect of antifungal substances synthesized by the antagonist, or these substances are produced in insufficient quantities for the inhibition (León *et al.* 2017).

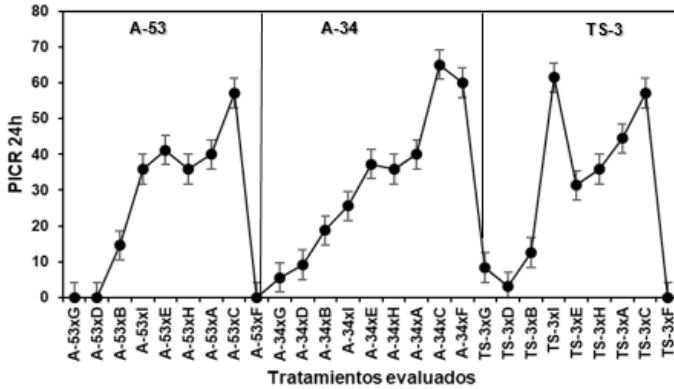


Figura 1. Antibiosis (PIRC 24h) ejercida por las cepas A-34, A-53 y TS-3 de *Trichoderma* spp., sobre aislados de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium phyllophilum* en cultivos duales. Las barras sobre la línea muestran el error estándar.

Figure 1. Antibiosis (PIRC 24h) exerted by the strains A-34, A-53 and TS-3 of *Trichoderma* spp., on isolates of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium phyllophilum* in dual crops. The bars above the line show the standard error.

Bajo las condiciones experimentales evaluadas, en las primeras 24 h los aislados F, G y D del fitopatógeno fueron los menos inhibidos por A-53 (*T. harzianum*) y TS-3 (*T. viride*), lo cual señaló que dichas cepas no lograron una antibiosis efectiva en este momento. Poniéndose de manifiesto que, en las primeras horas de interacción el hongo puede defenderse del efecto de las sustancias antifúngicas sintetizadas por el antagonista, o que dichas sustancias son producidas en cantidades insuficientes para la inhibición (León *et al.*, 2017).

Al analizar la interacción entre cepas de *Trichoderma* spp., y aislados de *Fusarium* spp., se registraron diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para la variable antagonismo. A las 168 h un 77,77 % de las

When analyzing the interaction between the strains of *Trichoderma* spp., and the isolates of *Fusarium* spp., significant differences were recorded between the treatments according to the Tukey's multiple comparison means test ( $p \leq 0.05$ ) for the variable antagonism. At 168 h 77.77% of the interactions corresponded to the class 2 of the scale and none isolate was placed in the class 4 or 5, considered of low antagonistic capacity, according to the described by Bell *et al.* (1982). This evidenced an intermediate antagonistic effect of the autochthonous strains of *Trichoderma* spp., on the *Fusarium* spp isolates evaluated (Table 3). The result suggests that the three strains of the antagonist can be evaluated in field to



interacciones correspondieron a la clase 2 de la escala y ningún aislado se ubicó en la clase 4 o 5, consideradas de baja capacidad antagonica, según lo descrito por Bell *et al.* (1982). Lo cual evidenció un efecto antagonista intermedio de las cepas autóctonas de *Trichoderma* spp., sobre los aislados de *Fusarium* spp. evaluados (cuadro 3). El resultado sugiere que las tres cepas del antagonista pueden ser evaluadas en campo para determinar su potencial de biocontrol sobre especies *F. oxysporum* y *F. phyllophilum*. Además, como tendencia se observaron los valores menos deseados de antagonismo en A-53 (*T. harzianum*) x D (*F. oxysporum*), TS-3 (*T. viride*) x H (*F. oxysporum*), A-53 (*T. harzianum*) x G (*F. phyllophilum*), TS-3 (*T. viride*) x G (*F. phyllophilum*) y A-53 (*T. harzianum*) x I (*F. phyllophilum*), representando un 18,51 % del total de las interacciones.

Pérez *et al.* (2017), al evaluar el efecto de *T. harzianum* (cepa A-34) sobre *P. grisea* en CD logró una ubicación de clase 1 en la escala de capacidad antagonica, dicha cepa logró expresar su máximo potencial competitivo sobre el hongo. En un estudio anterior Reyes (2012) demostró que a las 48 h un 86,44 % de los aislados de *T. harsianum* y *T. asperellum* frente a *Rhizoctonia solani*, se ubicaron en la clase 2 de la escala y posteriormente a las 96 h se registró un incremento de un 93,22 %. Los resultados de esta investigación son ligeramente inferiores a los expuestos anteriormente, debido a que los mismos se realizaron bajo diferentes condiciones experimentales y de duración del ensayo, así como, se utilizaron especies antagonistas y fitopatógenas distintas. No obstante, se demostró el potencial competitivo y antagonico que caracteriza a *Trichoderma* spp., como agente de biocontrol.

determine their potential of biocontrol on the species of *F. oxysporum* and *F. phyllophilum*. Also, as a tendency the least desired values of the antagonism were observed in A-53 (*T. harzianum*) x D (*F. oxysporum*), TS-3 (*T. viride*) x H (*F. oxysporum*), A-53 (*T. harzianum*) x G (*F. phyllophilum*), TS-3 (*T. viride*) x G (*F. phyllophilum*) and A-53 (*T. harzianum*) x I (*F. phyllophilum*), representing 18.51% of the total interactions.

Pérez *et al.* (2017), when evaluating the effect of *T. harzianum* (Strain A-34) on *P. grisea* in CD achieved a location of class 1 on the scale of antagonistic capacity, the said strain achieved to express its maximum competitive potential on the fungus. In a previous study Reyes (2012) showed that at 48 h 86.44% of the isolates of *T. harsianum* and *T. asperellum* against *Rhizoctonia solani*, were located in the class 2 of the scale and later at 96 h an increase of 93.22% was recorded. The results of this research are slightly inferior to those previously presented, due to the same were carried out under different experimental conditions and duration of the assay, as well as, different antagonist and phytopathogen species were used. However, the competitive and antagonistic potential that characterizes *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent was demonstrated.

From the scientific point of view, it was possible to demonstrate the mycoparasitic activity of *T. harzianum* (strains A-34 and A-53) and *T. viride* (strain TS-3) on all the isolates of *Fusarium* spp., between 72 and 96 h of confrontation in CD. Five main forms of mycoparasitism were

**Cuadro 3. Capacidad antagónica según la escala de Bell (1-5) ejercida por las cepas A-34, A-53 y TS-3 de *Trichoderma* spp., sobre los aislados de *F. oxysporum* y *F. phyllophilum* en cultivos duales.**

**Table 3. Antagonistic capacity according to the Bell scale (1-5) exercised by *Trichoderma* A-34, A-53 and TS-3 strains on *F. oxysporum* and *F. phyllophilum* isolations in dual crops.**

<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	Clase
A-53		2,00 a
A-34	A	2,00 a
TS-3		2,00 a
A-53		2,25 ab
A-34	B	2,00 a
TS-3		2,25 ab
A-53		2,00 a
A-34	C	2,00 a
TS-3		2,00 a
A-53		4,00 c
A-34	D	2,00 a
TS-3		2,00 a
A-53		2,25 ab
A-34	H	2,00 a
TS-3		3,25 bc
A-53		2,50 ab
A-34	E	2,00 a
TS-3		2,00 a
A-53		2,50 ab
A-34	F	2,00 a
TS-3		2,00 a
A-53		3,75 c
A-34	G	2,00 a
TS-3		3,00 abc
A-53		3,00 abc
A-34	I	2,00 a
TS-3		2,00 a
<b>EE<sup>2</sup></b>	-	<b>0,10</b>

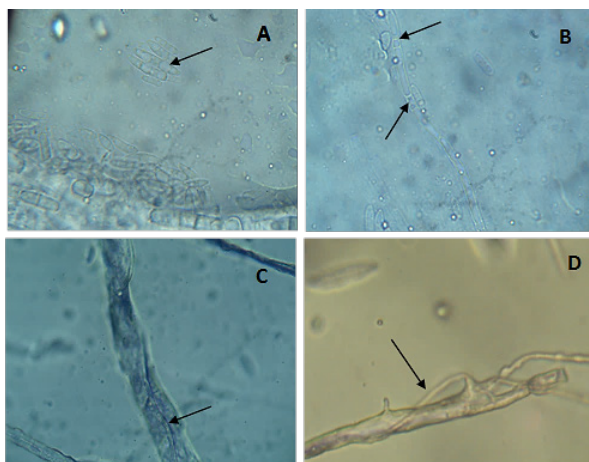
*Trichoderma* spp.: *T. harzianum* (A-53 y A-34) y *T. viride* (TS 3). *Fusarium* spp.: *F. oxysporum* (A, B, C, D, H) y *F. phyllophilum* (E, F, G, I). \*: error estándar. Letras diferentes en las columnas señalan diferencias significativas (Tukey, p<0,05).

*Trichoderma* spp.: *T. harzianum* (A-53 and A-34) and *T. viride* (TS 3). *Fusarium* spp.: *F. oxysporum* (A, B, C, D, H) and *F. phyllophilum* (E, F, G, I). \*: standard error. Different letters in the columns indicate significant differences (Tukey, p<0.05).

Desde el punto de vista científico se logró evidenciar la actividad micoparasítica de *T. harzianum* (cepas A-34 y A-53) y *T. viride* (cepa TS-3) sobre la totalidad de los aislados de *Fusarium* spp. entre las 72 y 96 h de confrontación en CD. Se constataron cinco formas principales de micoparasitismo, entre ellas, penetración (*T. harzianum*), enrollamiento (*T. harzianum*), vacuolización, deformación y granulación del contenido citoplasmático (*T. viride*) (figura 2).

observed, including penetration (*T. harzianum*), winding (*T. harzianum*), vacuolization, deformation and granulation of cytoplasmic contents (*T. viride*) (Figure 2).

According to Retana *et al.* (2018), when the direct interaction between the hyphas of the fungi (>24 h) is established, other mechanisms of action such as competition, mycoparasitism and hyperparasitism are manifested, which interrelated



**Figura 2.** Actividad micoparasítica ejercida por las cepas A-34, A-53 y TS-3 de *Trichoderma* spp., sobre aislados de *F. oxysporum* y *F. phyllophilum* en cultivos duales. Vacuolización citoplasmática de macroconidios y deformación (A) y granulación citoplasmática de hifas (B) cepa TS-3 (*T. viride*). Hifas del antagonista en el interior de hifas del fitopatógeno (C) cepa A-34 (*T. harzianum*). Hifa del antagonista enrollando a una hifa del fitopatógeno (D) cepa A-53 (*T. harzianum*). 40X.

**Figure 2.** Mycoparasitic activity exercised by the A-34, A-53 and TS-3 strains of *Trichoderma* spp., on isolates of *F. oxysporum* and *F. phyllophilum* in dual crops. Cytoplasmic vacuolization of macroconidia and deformation (A) and cytoplasmic granulation of hyphas (B) strain TS-3 (*T. viride*). Antagonist hyphas inside phytopathogenic hyphas (C) strain A-34 (*T. harzianum*). Antagonist hypfa by winding a phytopathogenic hypfa (D) strain A-53 (*T. harzianum*). 40X.

De acuerdo a Retana *et al.* (2018), cuando se establece la interacción directa entre las hifas de los hongos (>24 h), se manifiestan otros mecanismos de acción como competencia, micoparasitismo e hiperparasitismo, que interrelacionados con la síntesis de enzimas líticas proteinasas y quitinasas, así como, la secreción de metabolitos secundarios como trichodermina, gliovirina y gliotoxina, posibilitan de forma efectiva el proceso de biocontrol.

La vacuolización citoplasmática de los macroconidios de *Fusarium* spp., observada en esta investigación es raramente documentada en la literatura científica especializada que aborda esta temática y se relaciona con una afectación directa sobre la viabilidad de estas esporas. Probablemente, la acción enzimática del antagonista posibilitó la penetración, deformación, desintegración y muerte de las estructuras fúngicas del fitopatógeno. Al respecto, se estableció que estas formas de micoparasitismo coinciden con las señaladas por García (2016) para el género *Fusarium* spp. aislado de sábila y arándano. Según Rivera *et al.* (2016) en su estudio sobre el antagonismo de *Trichoderma* spp., frente al fitopatógeno *Stromatinia cepivora* (Berk.) Whetzel en el cultivo de cebolla, la actividad micoparasítica estuvo caracterizada por la vacuolización y la penetración.

Los resultados expuestos en esta investigación poseen relación con lo evidenciado por Hoyos *et al.* (2019), los cuales informaron alteraciones citoplasmáticas con presencia de

with the synthesis of lytic proteinase and chitinase enzymes, as well as the secretion of secondary metabolites such as trichodermin, gliovirin and gliotoxin, effectively enable the biocontrol process.

The cytoplasmic vacuolization of the macroconidia of *Fusarium* spp. observed in this research is rarely documented in the specialized scientific literature that addresses this issue and is related to a direct effect on the viability of these spores. Probably, the enzymatic action of the antagonist made possible the penetration, deformation, disintegration and death of the fungal structures of the phytopathogen. In this regard, it was established that these forms of micoparasitism coincide with those reported by Garcia (2016) for the genus *Fusarium* spp. isolated from aloe and blueberry. According to Rivera *et al.* (2016) in their study on the antagonism of *Trichoderma* spp. against the phytopathogen *Stromatinia cepivora* (Berk.) Whetzel in onion crops, micoparasitic activity was characterized by vacuolization and penetration.

The results presented in this research have relation with that evidenced by Hoyos *et al.* (2019), which informed about cytoplasmic alterations with presence of vacuoles and granulations, as well as winding of hyphas of *Trichoderma* spp. on *Fusarium* species that cause chili wilt in Mexico. Therefore, it was demonstrated in the study the effect of growth inhibition, antibiosis, antagonism and micoparasitism of the autochthonous strains of *Trichoderma*

vacuolas y granulaciones, así como enrollamiento de hifas de *Trichoderma* spp., sobre especies de *Fusarium* causantes de la marchites del chile en México. Por tanto, quedó demostrado en el estudio el efecto de inhibición del crecimiento, antibiosis, antagonismo y micoparasitismo de las cepas autóctonas de *Trichoderma* spp., A-34, A-53 y TS-3 sobre aislados nativos de *Fusarium* spp., procedentes de *N. tabacum* en la provincia Granma, Cuba.

A partir de un análisis integral de los resultados, se consideró que las cepas A-34 y TS-3 lograron las mejores tendencias de biocontrol; basado en los indicadores PICR, antibiosis y capacidad antagonista. Por tanto, se recomienda probar su uso en campo para el manejo de *F. oxysporum* y *F. phylophilum* en *N. tabacum*, mientras que, la cepa A-53 puede aplicarse de forma combinada con A-34 y TS-3 para potenciar su efecto. Lo anterior, señala la importancia práctica de estos resultados en la selección de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp., para el desarrollo de un biofungicida de interés agrícola local.

## Conclusiones

Se determina la actividad antagonista *in vitro* de cepas autóctonas de *T. harzianum* y *T. viride* sobre aislados de *Fusarium* spp., procedentes de *N. tabacum*. A los siete días de establecido el CD las cepas de *Trichoderma* spp., registran valores intermedios de inhibición del fitopatógeno, la competitividad del

spp., A-34, A-53 and TS-3 on native isolates of *Fusarium* spp. from *N. tabacum* in Granma province, Cuba.

From an integral analysis of the results, it was considered that the strains A-34 and TS-3 achieved the best biocontrol tendencies; based on the PICR indicators, antibiosis and antagonistic capacity. Therefore, it is recommended to test their use in the field for the management of *F. oxysporum* and *F. phylophilum* in *N. tabacum*, while strain A-53 can be applied in combination with A-34 and TS-3 to enhance their effect. The above, points out the practical importance of these results in the selection of autochthonous strains of *Trichoderma* spp. for the development of a biofungicide of local agricultural interest.

## Conclusions

The *in vitro* antagonistic activity of autochthonous strains of *T. harzianum* and *T. viride* on isolates of *Fusarium* spp. from *N. tabacum* was determined. Seven days after the establishment of the CD, the strains of *Trichoderma* spp. register intermediate values of inhibition of the phytopathogen, the competitiveness of the antagonist is located mainly in class two of Bell's scale and it is found that penetration, winding, vacuolization, deformation and granulation constitute the main forms of micoparasitism. Which points to this biocontrol method as an alternative to be considered for the management of *Fusarium* spp. in tobacco agroecosystems and the possibility of obtaining

antagonista se ubica mayoritariamente en la clase dos de la escala de Bell y se constata que, penetración, enrollamiento, vacuolización, deformación y granulación constituyen las principales formas de micoparasitismo. Lo cual señala a este método de biocontrol como una alternativa a tener en cuenta para el manejo de *Fusarium* spp., en agroecosistemas tabacaleros y no se descarta la posibilidad de obtener nuevos aislamientos autóctonos de *Trichoderma* spp., con vistas a evaluar su efecto sobre especies de *Fusarium* spp., que afectan a *N. tabacum*.

new autochthonous isolates of *Trichoderma* spp. is not discarded, with a view to evaluate its effect on species of *Fusarium* spp. that affect to *N. tabacum*.

---

### End of English Version

---

antifúngica de *Trichoderma asperellum* Samuels ante patógenos fúngicos que afectan al cultivo de la soya (*Glycine max* L.). Cult. Trop. 38(4):15-21.

Delgado-Ortiz, J., Y. Ochoa-Fuentes, E. Cerna-Chávez, M. Beltrán-Beache, R. Rodríguez-Guerra, L. Aguirre-Uribe y O. Vázquez-Martínez. 2016. Patogenicidad de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición basal del ajo en el centro norte de México. Rev. Argent. Microbiol. 48(3):222-228. doi: 10.1016/j.ram.2016.04.003.

Esquivel, G., A. Aranguré, O. Campos, C. Velasco, E. Crespo y C. Ayón. 2019. Evaluación *in vitro* de microorganismos antagonistas y fungicidas contra *Colletotrichum theobromicola* Delacr. causante de antracnosis en inflorescencias de guanábana (*Annona muricata* L.). Biocienc. 6:13.

Fernández, R. y C. Suárez. 2009. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. passiflorae en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. flavicarpa) del municipio zona bananera colombiana. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. 62(1):4743-4748.

García, L. 2016. Evaluación del antagonismo de cepas de *Trichoderma* spp. frente a cepas de *Fusarium* spp. y *Colletotrichum* spp. aisladas de cultivos orgánicos de sábila (*Aloe vera*) y arándano (*Vaccinium corymbosum*). Rev. Teckne. 13(1):56-66.

Gato, Y. 2010. Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. Fitosanidad. 14(3):189-195.

### Literatura citada

Bell, D., H. Wells and C. Markham. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology. 72(4):379-382.

Berrueto, L., G. Cárdenas, E. Harries, S. Stenglein, R. Curti, M. Rodríguez and Galván M. 2018. Characterization of *Fusarium* species associated with tobacco diseases in Northwestern Argentina. Eur. J. Plant Pathol. 151(4):1065-1079. doi: 10.1007/s10658-018-1443-6.

Carvajal, J., S. Rosero y W. Orozco. 2015. Aplicación de antagonistas microbianos para el control biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. bajo condiciones de campo. Rev. Fac. Nac. Agron. 68(1):7441-7450. doi:10.15446/rfnam.v68n1.47830.

Chiotta, M., S. Chulze y G. Barros. 2015. Fuentes de inóculo de especies de *Fusarium* potenciales productoras de micotoxinas en el agroecosistema soja. Rev. Fac. Cienc. Agrar. Univ. Nac. Cuyo. 47(2):171-184.

Cruz-Triana A., D. Rivero-González, B. Martínez-Coca, A. Echevarría-Hernández, y A. Tania-Rodríguez. 2017. Evaluación de la actividad







- Hernández, E., F. Castillo, R. Herrera, S. Fuentes, B. Drouaillet, y J. Santillán, A. 2016. Actividad antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* *in vitro*. Investigación y Ciencia. 24(67): 5-11.
- Hoyos, P., A. Luna-Cruz, E. Hernández, E. Gayosso, N. Valenzuela y H. Cureño. 2019. Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs. hongos asociados a la marchitez de Chile. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 10(6):1259-1272. doi:10.29312/remexca.v10i6.1326.
- Infante, D., B. Martínez, N. González y Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* sp. frente a hongos fitopatógenos. Rev. Protección Veg. 24(1):14-21.
- León, D., A. Cortés, y N. Sarmiento. 2017. Evaluación de la actividad fungicida e identificación de compuestos orgánicos volátiles liberados por *Trichoderma viride*. Rev. Colomb. Biotecnol. (Bogotá). 19(1): 63-70.
- Mendoza, J., M. Pérez, J. Prieto, J. Velásquez, J. Olivares y H. Langarica. 2015. Antibiosis de *Trichoderma* spp. cepas nativas del noreste de México contra el hongo patógeno *Macrophomina phaseolina*. Revista Brasileña de Microbiología. 46(4): 1093-1101.
- Pérez, E., A. Cabrera, P. Milanés, M. Leiva, Y. Sierra y R. Cupull. 2017. Actividad antagonista de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre el agente causal del tizón del arroz (*Pyricularia grisea* Sacc.). Ctro. Agr. 44(3):13-19.
- Retana, K., J. Ramírez, O. Castro, y M. Blanco. 2018. Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. Agron. Costarricense. 42 (1):115-126.
- Reyes, Y. 2012. Aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios para el control biológico del tizón de la vaina (*Rhizoctonia solani* Kühn) en arroz. Rev. Protección Veg. 27(1):68.
- Rivera, W., K. Meneses, C. Zúñiga y J. Brenes. 2016. Antagonismo de *Trichoderma* sp. ante el patógeno *Stromatinia cepivora* en el cultivo de cebolla. Tecnol. Marcha. 29(3):22-30. doi:10.18845/tm.v29i7.2702.
- Ronnie-Gakegne, E. y B. Martínez-Coca. 2018. Antibiosis y efecto de pH-temperatura sobre el antagonismo de cepas de *Trichoderma asperellum* frente a *Alternaria solani*. Rev. Protección Veg. 33(2):1-9.
- Sánchez, B., E. Espinosa, E. Villordo, R. Rodríguez y M. Mora. 2017. Identificación molecular y evaluación antagonista *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm. Agrocienza. 51(1):63-79.
- StatSoft, Inc. 2007. STATISTICA (Data Analysis Software System), version 8.0. www.statsoft.com.
- Suárez, C., R. Fernández, N. Osvaldo, M. Gámez y A. Páez. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Rev. Colomb. Biotecnol. (Bogotá). 10(2):35-43.
- Vargas, H., E. Rueda y E. Gilchrist. 2012. Antagonist activity of *Trichoderma asperellum* (fungi: ascomycota) at different temperatures. Acta Biol. 34(96):103-112.

## Susceptibilidad de *Diaphorina citri* a dimetoato y clorpirifos en huertas cítricas comerciales de Veracruz, México

Susceptibility of *Diaphorina citri* to dimethoate and chlorpyrifos in commercial citrus orchards of Veracruz, Mexico

Suscetibilidade de *Diaphorina citri* a dimetoato e clorpirifós em pomares comerciais de citros de Veracruz, México

Sherell Zamora Juárez<sup>1</sup>, Daniel Arturo Rodríguez- Lagunes<sup>1</sup>, Francisco Osorio-Acosta<sup>2\*</sup>, Odón Castañeda-Castro<sup>1</sup>, Rosalía Núñez-Pastrana<sup>1</sup> y Juan Carlos Noa-Carrazana<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, carretera Peñuela Amatlán, km 177, Córdoba, Veracruz, México CP. 94500. Correos electrónicos: (SZ) [sheamoraj@gmail.com](mailto:sheamoraj@gmail.com),  (DR) [darodriguez@uv.mx](mailto:darodriguez@uv.mx),  (OC) [odcastaneda@uv.mx](mailto:odcastaneda@uv.mx), ; (RN) [ronunez@uv.mx](mailto:ronunez@uv.mx), . <sup>2</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, carretera Xalapa-Veracruz, km 88.5, Tepetates municipio de Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, México C.P. 91690. Correo electrónico: (FO) [fosorioa@colpos.mx](mailto:fosorioa@colpos.mx); . <sup>3</sup>Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada, av. de las culturas Veracruzananas 101, colonia Emiliano Zapata, Xalapa, Veracruz, México, CP 91090. Correo electrónico: (JN) [jnoa@uv.mx](mailto:jnoa@uv.mx), .

### Resumen

En el estado de Veracruz se tienen reportes de resistencia a clorpirifos y dimetoato en poblaciones de *Diaphorina citri* por el uso excesivo de estos productos para el control de plagas, entre ellas *D. citri*. En este estudio se realizó un diagnóstico de la susceptibilidad de adultos de *D. citri* a clorpirifos y dimetoato, en huertas de cítricos comerciales del municipio de Martínez de la Torre, Veracruz. Para ello, en 30 huertas se colectaron 200 adultos de *D. citri* por huerta y se realizaron bioensayos de aplicación tópica con dimetoato a una concentración de 0,0090% y clorpirifos a una concentración de 0,0085%. Como testigo se utilizaron adultos de *D. citri* que no han sido expuestos a control químico durante 10 años. Los resultados de dimetoato y clorpirifos indicaron un

Recibido el 15-12-2020 • Aceptado el 25-02-2021.

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [fosorioa@colpos.mx](mailto:fosorioa@colpos.mx)



promedio de mortalidad de *D. citri* del 85%, en comparación con el testigo susceptible que presentó 99,3% y 98,8% de mortalidad con dimetoato y clorpirifos, respectivamente. Con base en esto se infiere que, en huertas de Martínez de la Torre, Veracruz existe cierto nivel de resistencia de *D. citri* a insecticidas organofosforados. Esta información permite definir el tipo de productos químicos a usar en la zona de estudio.

**Palabras clave:** organofosforados, susceptibilidad, presión de selección.

### Abstract

There are reports of *Diaphorina citri* resistance in the state of Veracruz to chlorpyrifos and dimethoate due to the excessive use of these products for the control of pests, among them *D. citri*. The purpose of this work was to diagnose the susceptibility of *D. citri* adults to chlorpyrifos and dimethoate in commercial citrus orchards of the municipality of Martínez de la Torre, Veracruz. For this, 200 adults of *D. citri* were collected in each of 30 orchards, and topical application bioassays were performed with dimethoate at 0.0090% concentration and chlorpyrifos at 0.0085% concentration. *Diaphorina citri* adults without chemical control during 10 years were used as a control. Mortality of *D. citri* with dimethoate and chlorpyrifos averaged 85%, in contrast the control mortality was 99% and 98.8% with dimethoate and chlorpyrifos, respectively. According to these results, it can be inferred that *D. citri* has some resistance to organophosphate insecticides in the orchards of Martínez de la Torre, Veracruz. This information can be used to decide the type of insecticides to apply in the study area.

**Key words:** organophosphates, susceptibility, selection pressure.

### Resumo

No estado de Veracruz há relatos de resistência ao clorpirifos e dimetoato em populações de *Diaphorina citri* devido ao uso excessivo desses produtos para o controle de pragas, entre elas *D. citri*. Neste estudo, foi realizado um diagnóstico da susceptibilidade de adultos de *D. citri* ao clorpirifós e ao dimetoato em pomares comerciais de citros do município de Martínez de la Torre, Veracruz. Para isso, em 30 pomares foram coletados 200 adultos de *D. citri* por horta e bioensaios de aplicação tópica com dimetoato na concentração de 0,0090% e clorpirifós na concentração de 0,0085%. Como controle, foram utilizados adultos de *D. citri* que não foram expostos ao controle químico por 10 anos. Os resultados de dimetoato e clorpirifós indicaram mortalidade média de *D. citri* de 85%, em comparação com o controle suscetível que apresentou mortalidade de 99% e 98,8% com dimetoato e clorpirifós, respectivamente. Com base nisso, infere-se que nos pomares de Martínez de la Torre, Veracruz, existe um certo nível de resistência de *D. citri* aos inseticidas organofosforados. Essas informações permitem definir os tipos de produtos químicos a serem utilizados na área de estudo.

**Palavras-chave:** organofosforados, suscetibilidade, pressão de seleção.

## Introducción

El psilido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri* Kuwayama) está presente en los 24 estados citrícolas de México y se encuentra en monitoreo constante (SENASICA, 2019), principalmente por ser vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) que causa el Huanglongbing (HLB), enfermedad crítica para la citricultura (Halbert and Manjunath, 2004). En México se estimaron pérdidas de 41,1% de la producción (ICA, 2010) por causa de esta enfermedad; por lo que, en cada uno de los estados se ha establecido una estrategia de manejo integrado denominada Áreas de Manejo Epidemiológico Fitosanitario (AMEFIs). Esta estrategia establece lineamientos para el manejo de *D. citri*, entre los que incluye el uso racional de insecticidas sintéticos en una superficie amplia en épocas biológicamente justificadas, con lo que se busca disminuir la dispersión del HLB y retrasar la resistencia de *D. citri* por el uso intensivo y mal manejo de químicos sintéticos (SENASICA, 2019).

A pesar de lo anterior, se reporta resistencia de *D. citri* a insecticidas en las entidades más representativas en la producción de cítricos en México; por ejemplo, en Michoacán en el año 2013 se reportó resistencia a los neonicotinoides (Vázquez-García *et al.*, 2013), y pérdida de susceptibilidad a organofosforados (Villanueva-Jiménez *et al.*, 2019); en Veracruz a organofosforados (García-Méndez *et al.*, 2016; 2019) y en Colima a

## Introduction

The Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama) is present in the 24 citrus growing states of Mexico and is under constant monitoring (SENASICA, 2019), mainly because it is a vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) that causes Huanglongbing (HLB), a critical disease for citriculture (Halbert and Manjunath, 2004). In Mexico, losses of 41.1% of the production were estimated (ICA, 2010) due to this disease; therefore, an integrated management strategy denominated Phytosanitary Epidemiological Management Areas (AMEFIs) has been established in each of the states. This strategy establishes guidelines for the management of *D. citri*, including the rational use of synthetic insecticides over a wide area in biologically justified seasons, which seeks to reduce the spread of HLB and delay the resistance of *D. citri* due to the intensive use and mismanagement of synthetic chemicals (SENASICA, 2019).

Despite the above, the resistance of *D. citri* to insecticides has been reported in the most representative entities in the production of citrus fruits in Mexico; for example, in Michoacán in 2013, the resistance to neonicotinoids was reported (Vázquez-García *et al.*, 2013), and the loss of susceptibility to organophosphates (Villanueva-Jiménez *et al.*, 2019); in Veracruz to organophosphates (García-Méndez *et al.*, 2016; 2019) and in Colima to pyrethroids (Pardo *et al.*, 2018). In the central zone of Veracruz state,

piretroides (Pardo *et al.*, 2018). En la zona centro del estado de Veracruz, los principales grupos toxicológicos que se utilizan en las huertas cítricas para el control de *D. citri* son organofosforados, carbamatos, neonicotinoides y piretroides (Córtez-Mondaca *et al.*, 2010; Díaz-Zorrilla *et al.*, 2011). En el municipio de Martínez de la Torre se reportó pérdida de susceptibilidad en ninfas de *D. citri* a clorpirifos combinado con aceite parafínico (Pérez-Zarate *et al.*, 2016) y en poblaciones de adultos se reporta resistencia a clorpirifos y dimetoato del grupo de organofosforados (García-Méndez *et al.*, 2016). Durante el 2018 en los municipios de Martínez de la Torre y Álamo, se registró baja mortalidad de *D. citri* a los mismos insecticidas (Osorio *et al.*, 2018, García-Méndez *et al.*, 2019) a pesar de que clorpirifos y dimetoato están prohibidos en la agricultura mexicana (Bejarano, 2017). Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue diagnosticar la susceptibilidad de adultos de *D. citri* a clorpirifos y dimetoato en huertas de cítricos comerciales del municipio de Martínez de la Torre, Veracruz.

## Material y Métodos

### Poblaciones de *D. citri* de invernadero

La colonia susceptible de *D. citri* fue proporcionada por el Dr. Juan A. Villanueva Jiménez del Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, y establecida en la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Veracruzana. La colonia no se encuentra sujeta

the main toxicological groups used in the citrus orchards to the control of *D. citri* were organophosphates, carbamates, neonicotinoids and pyrethroids (Córtez-Mondaca *et al.*, 2010; Díaz-Zorrilla *et al.*, 2011). In the municipality of Martínez de la Torre, a loss of susceptibility in nymphs of *D. citri* to chlorpyrifos combined with paraffinic oil was reported (Pérez-Zarate *et al.*, 2016) and in adult populations a resistance to chlorpyrifos and dimethoate of the organophosphate group was reported (García-Méndez *et al.*, 2016). During 2018 in the municipalities of Martínez de la Torre and Álamo, a low mortality of *D. citri* to the same insecticides was recorded (Osorio *et al.*, 2018, García-Méndez *et al.*, 2019) despite the fact that chlorpyrifos and dimethoate are prohibited in Mexican agriculture (Bejarano, 2017). Therefore, the objective of the present study was to diagnose the susceptibility of *D. citri* adults to chlorpyrifos and dimethoate in commercial citrus orchards in the municipality of Martínez de la Torre, Veracruz.

## Materials and methods

### Greenhouse populations of *D. citri*

The susceptible colony of *D. citri* was provided by Dr. Juan A. Villanueva Jiménez of the Postgraduate College, Veracruz Campus, and it was established in the Faculty of Biological and Agricultural Sciences of the Veracruzana University. The colony has not been subjected to selection pressure with any insecticide

a presión de selección con ninguna aplicación de insecticidas desde hace 10 años. La colonia se reproduce sobre plantas de lima Persa (*C. latifolia* Tanaka ex Jiménez), en un ambiente de invernadero ( $25 \pm 5^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 5\%$  de humedad relativa y fotoperiodo natural).

### **Poblaciones de *D. citri* de campo**

Los insectos de campo de *D. citri* se colectaron en 30 huertas comerciales de lima Persa y naranja valencia [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], ubicadas en la AMEFI del municipio de Martínez de la Torre, Veracruz, en el mes de octubre del año 2019 (Cuadro 1); la colecta de los adultos se llevó a cabo sin separación de sexos, colectando 240 adultos de *D. citri* por huerta, con aspiradores manuales elaborados con micropipetas de 1 mL (ThermoScientific®), con la punta cortada y la base sellada con tela de organza, en la cual se adaptó una manguera (García-Méndez *et al.*, 2016). Para mantener los insectos en cada aspirador se selló la punta de las micropipetas con Parafilm y se transportaron al laboratorio en una hielera a temperatura ambiente.

### **Insecticidas**

Los insecticidas evaluados fueron clorpirifos y dimetoato grado técnico, a una dosis letal 95 ( $\text{DL}_{95}$ ) para poblaciones de *D. citri*; la dosis para dimetoato fue de  $7,50 \text{ ng.insecto}^{-1}$  (ng: nanogramos de ingrediente activo) a una concentración de 0,0090% y clorpirifos  $5,68 \text{ ng.insecto}^{-1}$  a una concentración de 0,0085% (García-Méndez *et al.*, 2016).

application for 10 years. The colony reproduces on Persian lime plants (*C. latifolia* Tanaka ex Jiménez), in a greenhouse environment ( $25 \pm 5^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 5\%$  relative humidity and natural photoperiod).

### **Field populations of *D. citri***

The field insects of *D. citri* were collected in 30 commercial orchards of Persian lime and orange Valencia [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], located in AMEFI of Martínez de la Torre municipality, Veracruz, in October 2019 (Table 1); the collection of adults was carried out without separation of sexes, collecting 240 adults of *D. citri* per orchard, with manual aspirators made with 1 mL micropipettes (ThermoScientific®), with the cut off tip and the base sealed with organza fabric, to which a hose was adapted (García-Méndez *et al.*, 2016). To keep the insects in each aspirator, the tips of the micropipettes were sealed with Parafilm and transported to the laboratory in a cooler at room temperature.

### **Insecticides**

Chlorpyrifos and dimethoate technical grade insecticides were evaluated at a lethal dose 95 ( $\text{LD}_{95}$ ) for *D. citri* populations; the dose for dimethoate was  $7.50 \text{ ng.insect}^{-1}$  (ng: nanograms of active ingredient) at a concentration of 0.0090% and chlorpyrifos  $5.68 \text{ ng.insect}^{-1}$  at a concentration of 0.0085% (García-Méndez *et al.*, 2016).

### **Bioassay**

The bioassays made for the greenhouse insects (susceptible control) and those collected from the field were applied topically using the

**Cuadro 1. Georreferenciación de huertas donde se realizaron las colectas de *Diaphorina citri* en el municipio de Martínez de la Torre, Veracruz.**

**Table 1. Georeferencing of orchards where *Diaphorina citri* collections were made in the municipality of Martínez de la Torre, Veracruz.**

Localidad	AMEFIs	Coordenadas	Especie cultivada
Colonia Agrícola Suriana	02(Ruta 03)	N20.23103° W-97.08966°	<i>Citrus sinensis</i>
Balsas de Agua	02(Ruta 03)	N20.22425° W-97.10181°	<i>Citrus sinensis</i>
Colonia Agrícola Suriana	02(Ruta 04)	N20.23031° W-97.07307°	<i>Citrus latifolia-Citrus sinensis</i>
Arroyo Blanco	02(Ruta 04)	N20.22640° W-97.06635°	<i>Citrus latifolia</i>
Arroyo Blanco	02(Ruta 04)	N20.22101° W-97.06224°	<i>Citrus latifolia</i>
Arroyo Blanco	02(Ruta 04)	N20.20812° W-97.06419°	<i>Citrus latifolia</i>
Arroyo Blanco	02(Ruta 04)	N20.19469° W-97.06955°	<i>Citrus latifolia</i>
La Palma	02(Ruta 05)	N20.18268° W-97.06653°	<i>Citrus latifolia</i>
La Palma	02(Ruta 05)	N20.17573° W-97.06535°	<i>Citrus latifolia-Citrus sinensis</i>
Finca Flor de María	02(Ruta 05)	N20.11109° W-97.12620°	<i>Citrus latifolia</i>
Finca Flor de María	02(Ruta 05)	N20.09076° W-97.08648°	<i>Citrus latifolia</i>
Finca Flor de María	02(Ruta 05)	N20.02929° W-97.12811°	<i>Citrus latifolia</i>
Colonia Agrícola Suriana	02(Ruta 01)	N20.25300° W-97.05620°	<i>Citrus sinensis</i>
Colonia Agrícola Suriana	02(Ruta 01)	N20.25702° W-97.02319°	<i>Citrus sinensis</i>
Colonia Agrícola Suriana	02(Ruta 01)	N20.26144° W-97.06895°	<i>Citrus latifolia-Citrus sinensis</i>
Colonia Agrícola Suriana	02(Ruta 02)	N20.25337° W-97.06944°	<i>Citrus latifolia</i>
Colonia Agrícola Suriana	02(Ruta 02)	N20.24586° W-97.07159°	<i>Citrus latifolia-Citrus sinensis</i>
Colonia Agrícola Suriana	02(Ruta 02)	N20.24045° W-97.07713°	<i>Citrus latifolia</i>
Arroyo Blanco	02(Ruta 05)	N20.19460° W-97.06951°	<i>Citrus latifolia</i>
Arroyo Blanco	02(Ruta 05)	N20.18830° W-97.06863°	<i>Citrus sinensis</i>
La Palma	02(Ruta 02)	N20.18255° W-97.06546°	<i>Citrus latifolia</i>
Arroyo Blanco	02(Ruta 05)	N20.20203° W-97.06850°	<i>Citrus latifolia</i>
Loma de las Flores	02(Ruta 03)	N20.02637° W-97.04576°	<i>Citrus latifolia-Citrus sinensis</i>
Loma de las Flores	02(Ruta 03)	N20.02890° W-97.04537°	<i>Citrus latifolia</i>
Loma de las Flores	02(Ruta 03)	N20.02927° W-97.04425°	<i>Citrus latifolia</i>
Loma de las Flores	02(Ruta 03)	N20.03127° W-97.04528°	<i>Citrus latifolia</i>
Arroyo Fierro	02(Ruta 05)	N19.99213° W-97.00603°	<i>Citrus latifolia</i>
El Refugio	02(Ruta 04)	N19.99037° W-96.96737°	<i>Citrus latifolia-Citrus sinensis</i>
Rancho Cano	02(Ruta 04)	N19.98729° W-96.96334°	<i>Citrus latifolia</i>
Rancho Cano	02(Ruta 04)	N19.99503° W-96.95990°	<i>Citrus latifolia-Citrus sinensis</i>

AMEFIs: Áreas de Manejo Epidemiológico Fitosanitario.

AMEFIs: Phytosanitary Epidemiological Management Areas.

### Bioensayo

Los bioensayos realizados para los insectos de invernadero (testigo susceptible) y los colectados de campo fueron de aplicación tópica utilizando el método descrito por Tiwari *et al.* (2011) y García-Méndez *et al.* (2019). Los insectos se mantuvieron en ayuno durante aproximadamente dos horas y se colocaron en una bolsa Ziploc®, para anestésarlos con dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) durante 35 segundos (Mann *et al.*, 2012), para facilitar la aplicación del insecticida. Los adultos anestesiados se colocaron en cajas Petri de 4 cm de diámetro, previamente preparadas con una base de agar-agar (Merck®) de 3 mm al 1,5 %, sobre la base de agar-agar se añadió un pedazo de hoja de cítrico en forma de disco con el envés expuesto del mismo diámetro que las cajas Petri. Inmediatamente con una jeringa para cromatografía Hamilton® de 10 µL, acoplada a un microaplicador (Hamilton®) modelo PB-600 para bioensayos tópicos, se aplicó 0,2 µL de insecticida en el pronoto de cada insecto. Después se colocó la tapa de la caja Petri, a la que se le hizo una abertura circular cubierta con tela de organza, para controlar la aireación. De los insectos colectados en campo se colocaron en grupos de 20 por caja con un total de cinco cajas por huerta para cada insecticida, esto resulta en un total de 100 insectos por insecticida por huerta. Los 40 insectos colectados por huerta para utilizarlos en el tratamiento sin insecticida fueron tratados con 0,2 µL de acetona (Robertson *et al.*, 2017). Para la prueba en la colonia de invernadero, considerada susceptible,

method described by Tiwari *et al.* (2011) and García-Méndez *et al.* (2019). Insects were fasted for approximately two hours and placed in a Ziploc® bag and anesthetized with carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) for 35 seconds (Mann *et al.*, 2012) to facilitate the insecticide application. The anesthetized adults were placed in Petri dishes of 4 cm of diameter, previously prepared with a 3 mm agar-agar base (Merck®) at 1.5 %, on the agar-agar base, a piece of citrus leaf in the form of a disk with exposed underside of the same diameter as the Petri dishes was added. Immediately with a 10 µL Hamilton® chromatography syringe, coupled to a microapplicator (Hamilton®) model PB-600 for topical bioassays, 0.2 µL of insecticide was applied to the pronotum of each insect. After, the lid of the Petri dish was placed, with a circular opening covered with organza fabric to control the aeration. The insects collected in the field were placed in groups of 20 per box with a total of five boxes per orchard for each insecticide, resulting in a total of 100 insects per insecticide per orchard. The 40 insects collected per orchard for use them in the non-insecticide treatment were treated with 0.2 µL of acetone (Robertson *et al.*, 2017). For the test in the greenhouse colony, considered susceptible, 20 insects per box were placed, for a total of 30 dishes per insecticide at the same doses; for the test without insecticide (with technical grade acetone), five boxes with 20 insects each were used. For all the tests, mortality readings were taken 24 hours after the treatments were applied; insects that did not

se colocaron 20 insectos por caja, en un total de 30 cajas por insecticida a las mismas dosis; para la prueba sin insecticida (con acetona grado técnico) se utilizaron cinco cajas con 20 insectos cada una. Para todas las pruebas se realizó la lectura de mortalidad 24 horas después de aplicados los tratamientos, los insectos que no mostraron movimiento al ser estimulados con un pincel de punta fina, se consideraron muertos.

### Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar, los datos se analizaron con el software Statistica versión 8,0 (2007); se realizó una ANOVA y una prueba de Tukey con un intervalo de confianza de  $\alpha=0,05$ . La mortalidad de los insectos de campo (9,5%) y cría susceptible (3,1%) con la aplicación de acetona, se utilizó para obtener la mortalidad corregida de cada uno de los insecticidas aplicando la fórmula de Abbott (1925). El nivel máximo de mortalidad aceptable en el testigo sin insecticida es 12% (Finney, 1971).

### Resultados y discusión

El análisis de varianza mostró diferencia estadística ( $p<0,0001$ ) entre tratamientos, la prueba de medias de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) indicó que existe diferencia en la mortalidad entre los insectos de invernadero (testigo susceptible) y los de campo con el dimetoato y el clorpirifos, pero no entre los dos insecticidas con los insectos de campo ( $p\leq 0,99$ ) (Cuadro

show movement when stimulated with a fine-tipped brush were considered dead.

### Statistical Analysis

The experimental design was completely randomized, the data were analyzed with the Statistica software version 8.0 (2007); an ANOVA and a Tukey test with a confidence interval of  $\alpha=0.05$  was performed. The mortality of the field insects (9.5%) and susceptible brood (3.1%) with the application of acetone was used to obtain the corrected mortality of each of the insecticides by applying the Abbott formula (1925). The maximum level of acceptable mortality in the control without insecticide is 12% (Finney, 1971).

### Results and discussion

The analysis of variance showed statistical difference ( $p<0.0001$ ) between treatments, Tukey's mean test ( $\alpha=0.05$ ) indicated that there is a difference in the mortality among the greenhouse insects (susceptible control) and those from the field with dimethoate and chlorpyrifos, but not between the two insecticides with field insects ( $p\leq 0.99$ ) (Table 2). The adults of *D. citri* showed susceptibility very similar in the orchards with both insecticides, the mode of action of organophosphates in the insect has repercussions on the nervous and muscular system, with a tendency for rapid action, which is the reason why it generates an alarming percentage of loss of susceptibility and generation of resistance (IRAC, 2020).

2). Los adultos de *D. citri* mostraron una susceptibilidad muy similar en las huertas con ambos insecticidas, el modo de acción de los organofosforados en el insecto repercute en el sistema nervioso y muscular, con tendencia a una acción rápida, es la razón por la que genera un alarmante porcentaje de pérdida de susceptibilidad y generación de resistencia (IRAC, 2020).

**Mortality with dimethoate**

The mortality average of dimethoate was 85%, in contrast the susceptible brood presented 99.2% of mortality, and this shows a difference of 14% ( $p \leq 0.000008$ ). The highest percentage of *D. citri* mortality was 92% in the orchard number 2, and the orchards with the lowest percentage of mortality were 20 and 23, with a mortality of 73 and 78%, respectively

**Cuadro 2. Prueba de medias de Tukey para la mortalidad de *D. citri* de poblaciones de campo y el testigo susceptible con dimetoato y clorpirifos.**

**Table 2. Tukey’s mean test for *D. citri* mortality of field populations and the control susceptible to dimethoate and chlorpyrifos.**

Colonia/Insecticida	Media	Colonia/Insecticida	Probabilidad
Susceptible/dimetoato	99,2	Susceptible/clorpirifos	0,99
Susceptible/dimetoato	99,2	Campo/dimetoato	0,000008
Susceptible/clorpirifos	98,8	Campo/dimetoato	0,000008
Susceptible/clorpirifos	98,8	Campo/clorpirifos	0,000008
Campo/dimetoato	85,2	Campo/clorpirifos	0,99
Campo/clorpirifos	85	Susceptible/dimetoato	0,000008

**Mortalidad con dimetoato**

El promedio de la mortalidad del dimetoato fue de 85%, en contraste la cría susceptible presentó un 99,2% de mortalidad, esto muestra una diferencia de un 14% ( $p \leq 0.000008$ ). El mayor porcentaje de mortalidad de *D. citri* fue de 92% en la huerta número 2 y las huertas con menor porcentaje de mortalidad fueron la 20 y 23, con una mortalidad de 73 y 78%, respectivamente (Figura 1). Estos datos corroboran la prevalencia de la resistencia en generaciones actuales de *D. citri* por el manejo de insecticidas organofosforados de años

(Figure 1). These data corroborate the prevalence of the resistance in current generations of *D. citri* due to the management of organophosphate insecticides from previous years. The dimethoate was used in Mexico for the control of sucking insects several decades ago (Hernández-Fuentes *et al.*, 2012), because it was recommended in technical brochures by the Federal Government. There it was emphasized that dimethoate only had to be applied once a year and not overuse the doses, in order to prevent the generation of resistant insects (Córtez-Mondaca *et al.*, 2010; Díaz-Zorrilla *et al.*, 2011).



anteriores. El dimetoato fue utilizado en México para el control de insectos chupadores ya hace varias décadas (Hernández-Fuentes *et al.*, 2012), porque fue recomendado en folletos técnicos por el Gobierno Federal. Allí se destacaba que el dimetoato solo se tenía que aplicar una vez por año y no abusar de las dosis, para prevenir la generación de insectos resistentes (Córtez-Mondaca *et al.*, 2010; Díaz-Zorrilla *et al.*, 2011). El dimetoato degrada una enzima importante del sistema nervioso del insecto (acetilcolinesterasa) de modo que puede crear resistencia cruzada con insecticidas que comparten el mecanismo de acción, esto es común entre compuestos organofosforados y carbamatos resultando en una resistencia cruzada (Tiwari *et al.*, 2012).

García-Méndez *et al.* (2019) reportaron un promedio del 79,72% de mortalidad en adultos de *D. citri* en zonas de Martínez de la Torre, Veracruz para dimetoato, este dato es cercano al obtenido en este estudio (85%), por lo que podemos deducir que generaciones de *D. citri* de la zona aún mantienen niveles de tolerancia a éstos insecticidas.

#### **Mortalidad con clorpirifos**

El promedio de mortalidad de *D. citri* para clorpirifos fue igual al dimetoato con un 85%, la mortalidad varió de 77% al 95%. La cría susceptible presentó un 98,8% de mortalidad, la diferencia con los insectos de campo fue de 13,8% ( $p \leq 0,000008$ ) (Figura 2). Aunque en una huerta se observó la mortalidad mínima esperada del 95%, el promedio general fue bajo, esto indica

Dimethoate degrades an important enzyme of the insect nervous system (acetylcholinesterase) so that it can create cross-resistance with insecticides that share the mechanism of action; this is common between organophosphorus compounds and carbamates resulting in cross-resistance (Tiwari *et al.*, 2012).

García-Méndez *et al.* (2019) reported a mortality average of 79.72% in adults of *D. citri* in zones of Martínez de la Torre, Veracruz for dimethoate, this data is close to that obtained in this study (85%), and therefore we can deduce that the generations of *D. citri* of the area still maintain the tolerance levels to these insecticides.

#### **Chlorpyrifos mortality**

The mortality average of *D. citri* for chlorpyrifos was equal to dimethoate at 85%, mortality ranged from 77% to 95%. The susceptible brood presented 98.8% of mortality, the difference with the field insects that was 13.8% ( $p \leq 0.000008$ ) (Figure 2). Although the minimum expected mortality of 95% was observed in one orchard, the overall average was low; this indicates a natural variability in the insect. The resistance of *D. citri* to chlorpyrifos and dimethoate has been reported since 2013 in orchards in Florida, United States and Pakistan (Tiwari *et al.*, 2013; Naeem *et al.*, 2016), due to it was a widely used product for the control of *D. citri*. In Mexico the constant use of this toxicological group is totally linked to the development of resistant populations as has been demonstrated in the central zone of Veracruz and the state of Michoacán (Vázquez-García *et al.*, 2013; García-

una variabilidad natural en el insecto. La resistencia de *D. citri* a clorpirifos y dimetoato se ha reportado desde el año 2013 en huertas de Florida, Estados Unidos y Pakistán (Tiwari *et al.*, 2013; Naeem *et al.*, 2016), ya que fue un producto muy utilizado para el control de *D. citri*. En México el uso constante de este grupo toxicológico está totalmente ligado al desarrollo de poblaciones resistentes como se ha demostrado en la zona centro de Veracruz y del estado de Michoacán (Vázquez-García *et al.*, 2013; García-Méndez *et al.*, 2016). Los insecticidas del grupo toxicológico de organofosforados son los más utilizados en la citricultura por ser fáciles de conseguir, baratos y recomendados por las casas productoras por su eficacia (Means, 2013).

Méndez *et al.*, 2016). Insecticides of the organophosphate toxicological group are the most widely used in citriculture because they are easy to obtain, cheap and recommended by company for their efficacy (Means, 2013).

In Martínez de la Torre, the mortality in nymphs of *D. citri* was monitored in different years, resulting in resistance to two types of synthetic insecticides of the organophosphate group: chlorpyrifos and dimethoate (García-Méndez *et al.*, 2016; 2019). In a similar study in Martínez de la Torre and Álamo, loss of susceptibility in adults of *D. citri* to chlorpyrifos and dimethoate was reported (Osorio-Acosta *et al.*, 2018), subsequently the resistance

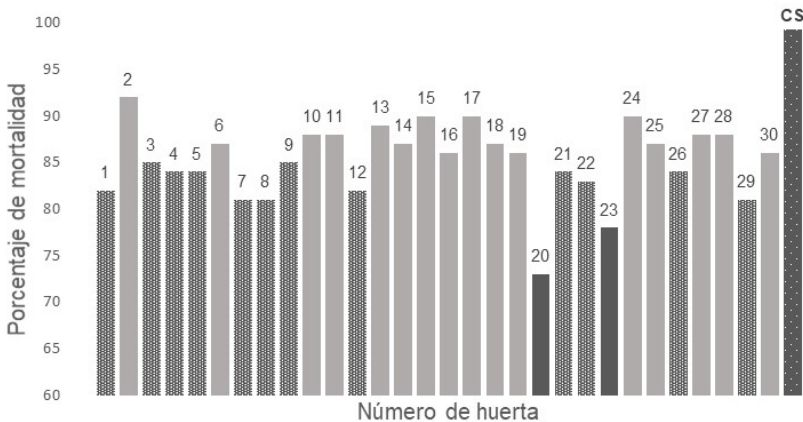


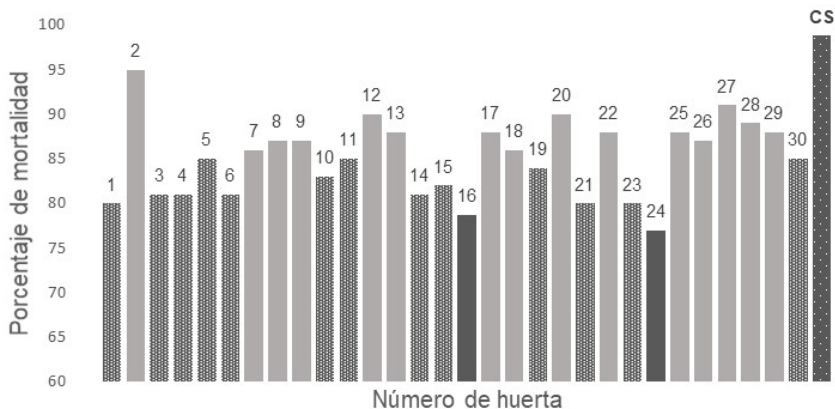
Figura 1. Porcentaje de mortalidad de dimetoato en poblaciones de *D. citri* en 30 huertas ubicadas en la zona centro del estado de Veracruz. CS=Cría susceptible.

Figure 1. Percentage of dimethoate mortality in populations of *D. citri* in 30 orchards located in the central zone of the state of Veracruz. CS=Susceptible brood.

En Martínez de la Torre se monitoreó la mortalidad en ninfas de *D. citri* en diferentes años dando como resultado la resistencia a dos tipos de insecticidas sintéticos del grupo de organofosforados: clorpirifos y dimetoato (García-Méndez *et al.*, 2016; 2019). En un estudio similar en Martínez de la Torre y Álamo se reportó pérdida de susceptibilidad en adultos de *D. citri* a clorpirifos y dimetoato (Osorio-Acosta *et al.*, 2018), posteriormente se confirmó la resistencia a clorpirifos en el estado de Veracruz (Villanueva-Jiménez *et al.*, 2019); por lo cual se puede inferir que las poblaciones *D. citri* de campo siguen mostrando poca susceptibilidad al grupo toxicológico de organofosforados después de cuatro años.

to chlorpyrifos was confirmed in the state of Veracruz (Villanueva-Jiménez *et al.*, 2019); therefore, it can be inferred that the field *D. citri* populations continue to show the low susceptibility to the toxicological group of organophosphates after four years.

It is well established that the resistance does not evolve at the same rate in all the species or populations. The resistance can develop rapidly in some populations and slowly in others (Georghiou, 1994). The constant application of synthetic insecticides in the citrus-growing area of the state of Veracruz, has led to decrease the effectiveness of different toxicological groups, such as with organophosphates which share the resistance mechanism P450 cytochrome of cytochrome and



**Figura 2. Porcentaje de mortalidad de clorpirifos en poblaciones de *D. citri* en 30 huertas ubicadas en la zona centro del estado de Veracruz. CS=Cría susceptible.**

**Figure 2. Mortality percentage of chlorpyrifos in populations of *D. citri* in 30 orchards located in the central zone of the state of Veracruz. CS=Susceptible brood.**

Está bien establecido que la resistencia no evoluciona al mismo ritmo en todas las especies o poblaciones. La resistencia puede desarrollarse rápidamente en algunas poblaciones y lentamente en otras (Georghiou, 1994). La aplicación constante de insecticidas sintéticos en la zona citrícola del estado de Veracruz, ha llevado a disminuir la efectividad de distintos grupos toxicológicos, como con los organofosforados los cuales comparten con los carbamatos el mecanismo de resistencia del citocromo P450 del citocromo y glutatión-S-transferasas (GTS) (Ortega *et al.*, 1998; Tiwari *et al.*, 2011).

Conocer la susceptibilidad que tiene el insecto vector a diferentes insecticidas, sirve como base en la toma de decisiones para buen manejo de insecticidas sintéticos, el control de la plaga y así evitar la resistencia cruzada, garantizando la efectividad del producto que se aplique, ya sea de base sintética o natural.

## Conclusiones

La mortalidad promedio de *D. citri* obtenida con el dimetoato y clorpirifos fue baja considerando que fue una aplicación tópica a una  $DL_{95}$ , por lo que se puede considerar que la población de campo estudiada presenta cierto nivel de resistencia; comparado con la colonia de invernadero (susceptible) que presentó una mortalidad cercana al 100% para las mismas dosis de insecticidas. Existen diferentes niveles de susceptibilidad de *D. citri* en el área de estudio, esto queda evidenciado por las diferencias en mortalidad en las diferentes huertas.

glutathione-S-transferasas (GTS) with carbamates (Ortega *et al.*, 1998; Tiwari *et al.*, 2011).

Knowing the susceptibility of the vector insect to different insecticides serves as a basis for decision making for good management of synthetic insecticides, pest control and thus avoiding cross-resistance, ensuring the effectiveness of the product applied, either synthetic or natural based.

## Conclusions

The average mortality obtained of *D. citri* with the dimethoate and chlorpyrifos was low, considering that it was a topical application at a  $DL_{95}$ , therefore, it can be considered that the field population studied presents a certain resistance level; compared to the greenhouse colony (susceptible) that presented a mortality close to 100% for the same doses of insecticides. There are different levels of susceptibility of *D. citri* in the area under study; this is evidenced by the differences in mortality of the different orchards. The level of susceptibility of *D. citri* to organophosphates can affect the new products with the same mode of action, so these values can be used as reference for future studies about loss of susceptibility.

### End of English Version

El nivel de susceptibilidad de *D. citri* a los organofosforados puede afectar a nuevos productos con el mismo modo de acción, así que estos valores pueden ser utilizados como referencia para estudios posteriores de pérdida de susceptibilidad.

## Literatura citada

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Bejarano, F. G. Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México. 2017. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México, A. C. (RAPAM). Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/319515704\\_Los\\_Plaguicidas\\_Altamente\\_Peligrosos\\_en\\_Mexico](https://www.researchgate.net/publication/319515704_Los_Plaguicidas_Altamente_Peligrosos_en_Mexico). Fecha de consulta: noviembre 2020.
- Córtez-Mondaca, E., J. I. López-Arroyo, L. M. Hernández-Fuentes, A. Fu-Castillo, y J. Loera-Gallardo. 2010. Control químico de *Diaphorina citri* Kuwayama en cítricos dulces, en México: Selección de insecticidas y épocas de aplicación. Folleto Técnico No. 35. INIFAP, México. 22 p.
- Díaz-Zorrilla, U., H. Cabrera-Mireles, J. A. Villanueva-Jiménez, F.D. Murillo-Cuevas, y J. I. López Arroyo. 2011. Selección de insecticidas y épocas de aplicación para el control de psílido asiático en limón persa en Veracruz. Folleto técnico No. 6. INIFAP, México, 16 p. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/338633525\\_Seleccion\\_de\\_Insecticidas\\_y\\_Epocas\\_de\\_Aplicacion\\_para\\_el\\_Control\\_del\\_Psilido\\_Asiatico\\_en\\_Limon\\_Persa\\_en\\_Veracruz](https://www.researchgate.net/publication/338633525_Seleccion_de_Insecticidas_y_Epocas_de_Aplicacion_para_el_Control_del_Psilido_Asiatico_en_Limon_Persa_en_Veracruz). Fecha de consulta: Noviembre 2020
- Finney, D. J. 1971. *Statistical Method in Biological Assay*. Griffing, London. 2nd Ed. 668.
- García-Méndez, V. H., L. D. Ortega-Arenas, J. A. Villanueva-Jiménez y H. Sánchez-Arroyo. 2016. Susceptibilidad de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) a insecticidas en Veracruz, México. *Agrociencia*, 50: 335- 365.
- García-Méndez, V. H., L. D. Ortega-Arenas, J. A. Villanueva-Jiménez y F. Osorio-Acosta. 2019. Resistencia de *Diaphorina citri* Kuwayama a Insecticidas en Cinco Áreas Regionales de Control en México. *Southw. Entomol.* 44: 947-954.
- Georghiou, G. 1994. Principles of insecticide resistance management. *Phytoprotection*, 75(4), 51–59. <https://doi.org/10.7202/706>
- Halbert, S. E.; Manjunath, K. L. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Fla. Entomol.* 87: 330-353
- Hernández-Fuentes, L. M., M. A. Urias-López, J. I. López-Arroyo, R. Gómez-Jaimes, y N. Bautista-Martínez. 2012. Control químico de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en lima persa *Citrus latifolia* Tanaka. *Rev. Mexicana cienc. agríc.* 3:427-439.
- IICA. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 2010. Evaluación del impacto económico de la enfermedad de los cítricos HLB (greening) en la cadena cítrica mexicana. Disponible en: <http://www.cofemersimir.gob.mx/expediente/12025/mir/31228/anexo/879544>. Fecha de consulta: septiembre 2020.
- IRAC. Insecticide resistance action committee. 2020. IRAC Mode of Action Classification Scheme. Disponible en: [https://irac-online.org/content/uploads/modo\\_de\\_%20accion\\_%20Oct%2011.pdf](https://irac-online.org/content/uploads/modo_de_%20accion_%20Oct%2011.pdf). Fecha de consulta: noviembre 2020.
- Mann, S. R., S. Tiwari, J. M. Smoot, L. R. Rouseff, and L. L. Stelinski. 2012. Repellency and toxicity of plant-based essential oils and their constituents against *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *J. Appl. Entomol.* 136: 87-96.
- Means, C. 2013. Organophosphate and carbamate insecticides. In P.A. Talcott and S. W. B. Saunders [eds.], *Small Animal Toxicology*, 3rd ed. Elsevier, Saint Louis, MO. pp. 715-724
- Naeem, A., S. Freed, F. L. Jin, M. Akmal, and M. Mehmood. 2016. Monitoring of insecticide resistance in *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) from citrus groves of Punjab, Pakistan. *Crop Prot.* 86: 62-68.

- Ortega A., L. D., A. Lagunes T, J. C. Rodríguez M., C. Rodríguez H., R. Alatorre R, y N. M. Bárcenas O. 1998. Susceptibilidad a insecticidas en adultos de mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum* (West.) (Homoptera: Aleyrodidae) de Tepoztlán, Morelos, México. *Agrociencia* 32: 249-254.
- Osorio-Acosta F., J. A. Villanueva-Jiménez, L. D. Ortega-Arenas, V. H. García-Méndez, U. Díaz-Zorrilla, J. Luna-Olivares, S. Zamora-Juárez, R. José-Pablo, G. Luna-Olivares y R. L. Aguirre-Hernández. 2018. Resultados del programa nacional de monitoreo de la resistencia al vector del HLB en los estados citrícolas de México Avances en Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal, Acuicola, Pesquería, Desarrollo rural, Transferencia de tecnología, Biotecnología, Ambiente, Recursos naturales y Cambio climático. 1791-1799. Disponible en: <http://rctveracruz.org/assets/files/AvancesInvestigacionRC2018.pdf>. Fecha de consulta: Noviembre 2020
- Pardo, S., M. Martínez A., I. Figueroa J., M. Chavarrieta J., E. Viñuela, A. Rebollar A., A. M. Miranda, J. Valle, and S. Pineda. 2018. Insecticide resistance of adults and nymphs of Asian citrus psyllid populations from Apatzingán Valley, Mexico. *Pest Manag. Sci.* 74: 135-140.
- Pérez-Zarate L. A., F. Osorio-Acosta, J. A. Villanueva-Jiménez, L. D. Ortega-Arenas, R. G. Chiquito-Contreras. 2016. Factores que Inciden en el Control Químico de *Diaphorina citri* Kuwayama en Áreas Regionales de Control. *Southw. Entomol*, 41:1037-1050.
- Robertson, J. L., M. Jones M., E. Olguín E., and B. Alberts. 2017. *Pesticide Bioassays with Arthropods*. 3rd ed. CRC Press, FL. Disponible en: <https://www.crcpress.com/Bioassays-with-Arthropods/Robertson-Jones-Olguin-Alberts/p/book/97814822>. Fecha de consulta: Noviembre 2020
- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2019. Manual operativo de la campaña contra plagas reglamentadas de los cítricos. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/455772/Manual\\_Operativo\\_Plagas\\_de\\_los\\_Citricos\\_2019.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/455772/Manual_Operativo_Plagas_de_los_Citricos_2019.pdf). Fecha de consulta: noviembre 2020.
- Statistica, 2007. Data analysis software system 2007 versión 8.0. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)
- Tiwari, S., K. Pelz, R. Manny, and L. L. Stelinski. 2011. Glutathione transferase and cytochrome P450 (general oxidase) activity levels in *Candidatus Liberibacter asiaticus*-infected and uninfected Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 104: 297-305.
- Tiwari, S., L. L. Stelinski, and M. E. Rogers. 2012. Biochemical basis of organophosphate and carbamate resistance in Asian citrus psyllid. *J. Econ. Entomol.* 105:540-548.
- Tiwari, S., N. Killiny, and L. L. Stelinski. 2013. Dynamic insecticide susceptibility changes in Florida populations of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *J. Econ. Entomol.* 106:393-399.
- Vázquez-García, M., J. J. Velázquez M., M. Medina V., D. Cruz C., M. Sandoval, G. Virgen, and P. Torres. 2013. Insecticide resistance in adult *Diaphorina citri* Kuwayama from lime orchards in central west Mexico. *Southw. Entomol.* 38: 579-596.
- Villanueva-Jiménez J. A., F. Osorio-Acosta, L. D. Ortega-Arenas, U. Díaz-Zorrilla, V. H. García-Méndez, J. Luna Olivares, G. Luna Olivares, S. Zamora Juárez. 2019. Susceptibilidad de *Diaphorina citri* a insecticidas en los 24 estados que operaron la campaña contra HLB en 2018. In: Vinay, V. J. C., V. A. Esqueda E., O. H. Tosquy V., R. Zetina L., A. Ríos U., M. V. Vázquez H., A. L. Del Ángel P. y C. Perdomo M. (comps.). *Avances en investigación científica, pecuaria, forestal, acuicola, pesquería, desarrollo rural, transferencia de tecnología, biotecnología, recursos naturales y cambio climático*. p. 2285-2295. Disponible en: <http://rctveracruz.org/publicaciones.html>. Fecha de consulta: noviembre 2020





## Nota técnica / Technical note

### Crecimiento de cuatro tipos de *Capsicum* spp. en sustratos bajo ambiente protegido

Growth of four types of *Capsicum* spp. in substrates under a protected environment

Crescimento de quatro tipos de *Capsicum* spp. em sustratos sob ambiente protegido

Francisco Higinio Ruiz-Espinoza<sup>1</sup>, Juan Carlos Rodríguez-Ortiz<sup>2</sup>, Félix Alfredo Beltrán-Morales<sup>1</sup> y Fernando de Jesús Carballo-Méndez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Baja California Sur, Departamento Académico de Agronomía. La Paz, Baja California Sur. México. Correos electrónicos: (FHR) [fruiz@uabcs.mx](mailto:fruiz@uabcs.mx) ; (FAB) [abeltran@uabcs.mx](mailto:abeltran@uabcs.mx) ; (FJC) [ing.fercarballo@gmail.com](mailto:ing.fercarballo@gmail.com) . <sup>2</sup>Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Agronomía y Veterinaria. Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí. México. Correo electrónico: [juancarlos.rodriguez@uaslp.mx](mailto:juancarlos.rodriguez@uaslp.mx) .

### Resumen

El crecimiento de las plantas depende de las condiciones ambientales, condiciones de manejo y de suelo, es por ello que en esta investigación se planteó evaluar el crecimiento de chiles en sustrato a base de arena, bajo ambiente protegido. Los tratamientos evaluados fueron: 1) suelo (testigo), 2) arena, 3) arena-perlita (4:1) y 4) arena-perlita (1,5:1), los cuales se establecieron bajo un diseño completamente al azar con seis repeticiones. Las especies utilizadas fueron *Capsicum annuum* L. tipos húngaro, serrano y jalapeño, y *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav. tipo manzano. Las mezclas de arena-perlita beneficiaron el crecimiento de los chiles, respecto al suelo y arena. Por lo anterior, las mezclas de arena-perlita deben ser consideradas como una alternativa para producir chiles en contenedor.

**Palabras clave:** arena, *Capsicum annuum* L., *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav., perlita.

Recibido:18-12-2020 • Aceptado: 24-03-2021.

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [ing.fercarballo@gmail.com](mailto:ing.fercarballo@gmail.com)

## Abstract

Plant growth depends on environmental conditions, management conditions and soil conditions, which is why in this research we evaluated the growth of chili peppers in a sand-based substrate, under a protected environment. The treatments evaluated were: 1) soil (control), 2) sand, 3) sand-perlite (4:1) and 4) sand-perlite (1.5:1), which were established under a completely randomized design with six replications. The species used were *Capsicum annuum* L. Hungarian, serrano and jalapeño types, and *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav. apple type. The sand-perlite mixtures benefited the growth of the chili peppers, with respect to soil and sand. Therefore, sand-perlite mixtures should be considered as an alternative to produce chili peppers in containers.

**Keywords:** *Capsicum annuum* L., *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav., *perlite*, sand.

## Resumo

O crescimento das plantas depende das condições ambientais, de gestão e das condições do solo, razão pela qual nesta investigação foi proposto avaliar o crescimento da pimenta em substrato à base de areia, sob ambiente protegido. Os tratamentos avaliados foram: 1) solo (controle), 2) areia, 3) areia-perlita (4:1) e 4) areia-perlita (1,5: 1), os quais foram estabelecidos sob um delineamento inteiramente casualizado com seis repetições. As espécies utilizadas foram *Capsicum annuum* L. Hungarian, tipos serrano e jalapeño, e *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav. tipo de macieira. As misturas de areia-perlita beneficiaram o crescimento da malagueta, no que diz respeito ao solo e à areia. Portanto, as misturas de areia-perlita devem ser consideradas como uma alternativa para produzir pimentas em recipientes

**Palavras-chave:** areia, *Capsicum annuum* L., *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav., *perlite*.

## Introducción

El chile es uno de los cultivos de mayor importancia a nivel mundial. México es considerado como el centro de domesticación debido a la evidencia que data de miles de años y a que existe gran diversidad de chiles; dentro del género *Capsicum* existen diversas especies de interés económico, como lo son *C. annuum* donde sobresalen los tipos jalapeño y serrano, y *C.*

## Introduction

Chili is one of the most important crops worldwide. Mexico is considered the center of domestication due to the evidence dating back thousands of years and the great diversity of chili peppers; Within the genus *Capsicum* there are various species of economic interest, such as *C. annuum* where the jalapeño and serrano types stand out, and *C. pubescens* where the apple



*pubescens* donde sobresale el tipo manzano (García-Gaytán *et al.*, 2017). Actualmente existe una transición de sistemas de producción de campo abierto a sistemas protegidos como lo son invernadero, malla sombra o túnel, los cuales se asocian a la utilización de sustratos debido a diversos problemas que enfrenta el suelo, como la salinidad, desbalances iónicos, dispersión de suelo por exceso de sodio, problemas de compactación, además de que en el suelo se pueden encontrar agentes patógenos y sustancias químicas contaminantes (Kopittke *et al.*, 2019). En los sistemas de producción en ambiente protegido comúnmente se utilizan sustratos homogéneos, sin embargo, en pequeños sistemas puede ser factible la mezcla de materiales para obtener sustratos eficientes y económicos para la producción de diferentes especies (Hasan *et al.*, 2014). La creciente necesidad de encontrar técnicas que contribuyan al uso eficiente del agua y nutrimentos ha llevado al estudio de nuevos materiales, de manera individual y en mezclas, para su uso como sustratos hortícolas (Othman *et al.*, 2019). Los materiales utilizados en la producción de cultivos deben de cumplir con al menos tres funciones: proveer agua y aireación a la raíz, permitir el máximo crecimiento de las raíces y dar soporte a las plantas (Olle *et al.*, 2012). Algunos materiales usados como sustratos son arena, grava, perlita, piedra pómez, piedra volcánica, lana de roca, por mencionar algunos; cada material tiene características específicas que afectarán directa o indirectamente el

tree type stands out (García-Gaytán *et al.*, 2017). Currently there is a transition from open field production systems to protected systems such as greenhouse, shade mesh or tunnel, which are associated with the use of substrates due to various problems faced by the soil, such as salinity, ionic imbalances, dispersion of soil due to excess sodium, compaction problems, in addition to the fact that pathogens and polluting chemicals can be found in the soil (Kopittke *et al.*, 2019). In protected environment production systems, homogeneous substrates are commonly used, however, in small systems it may be feasible to mix materials to obtain efficient and economical substrates for the production of different species (Hasan *et al.*, 2014). The growing need to find techniques that contribute to the efficient use of water and nutrients has led to the study of new materials, individually and in mixtures, for use as horticultural substrates (Othman *et al.*, 2019). The materials used in the production of crops must fulfill at least three functions: provide water and aeration to the root, allow maximum root growth and support the plants (Olle *et al.*, 2012). Some materials used as substrates are sand, gravel, perlite, pumice stone, volcanic stone, rock wool, to name a few. Each material has specific characteristics that will directly or indirectly affect the growth and development of the plant (Ghehsareh and Kalbasi, 2012). The various geographic regions have endless materials that can be used as substrates, which leads to cost reduction and avoids contamination

crecimiento y desarrollo de la planta (Ghehsareh y Kalbasi, 2012). Las diversas regiones geográficas cuentan con un sinnúmero de materiales que se pueden usar como sustratos, lo que propicia una reducción de costos y evita la contaminación posterior a su uso, reduciendo el impacto ambiental (Cruz-Crespo *et al.*, 2014). La arena como sustrato para la producción hortícola ha mostrado beneficios en el manejo de los cultivos, básicamente por la baja capacidad de intercambio catiónico que posee y por la buena capacidad de aireación, además, desde el punto de vista económico la arena es un sustrato barato, ya que se encuentra en prácticamente todas las regiones del planeta y, además, puede ser reutilizado (Wang *et al.*, 2016). La perlita es otro sustrato utilizado ya que favorece el crecimiento de las raíces proporcionando un equilibrio óptimo de humedad, con lo cual incrementa la producción y la calidad de los frutos (Jerca *et al.*, 2015). Además del tipo de sustrato, el resultado de la producción y calidad de los productos dependerá en gran medida del manejo que se dé al sustrato (Olaría *et al.*, 2016). Dado que las características morfológicas de las plantas de Chile varían respecto al tipo de Chile, al ambiente y el manejo agronómico de la planta, se estableció como objetivo el evaluar el crecimiento de cuatro tipos de chiles cultivados en sustratos a base de arena, en condiciones de ambiente protegido.

## Material y métodos

El experimento se desarrolló dentro de una estructura de madera

after use, reducing environmental impact (Cruz-Crespo *et al.*, 2014). Sand as a substrate for horticultural production has shown benefits in crop management, basically due to its low cation exchange capacity and its good aeration capacity, in addition, from an economic point of view sand is a cheap substrate, since it is found in practically all regions of the planet and, in addition, it can be reused (Wang *et al.*, 2016). Perlite is another substrate used since it favors root growth by providing an optimal moisture balance, thereby increasing the production and quality of the fruits (Jerca *et al.*, 2015). In addition to the type of substrate, the result of the production and quality of the products will largely depend on the management given to substrate (Olaría *et al.*, 2016). Given that the morphological characteristics of chili plants vary with respect to the type of chili, the environment and the agronomic management of the plant, the objective was to evaluate the growth of four types of chili peppers grown in sand-based substrates, under protected environment conditions.

## Materials and methods

The experiment was developed within a wooden structure and a concrete floor with an area of 105 m<sup>2</sup> (7 m wide by 15 m long) and a height of 4 m, covered with a black mesh of 50 % shading, located in the San Fernando ranch, Municipality of La Paz, Baja California Sur, Mexico, located at coordinates 24°03'48" north latitude and 110°24'37" west longitude, at an

y piso de concreto con un área de 105 m<sup>2</sup> (7 m de ancho por 15 m de largo) y una altura de 4 m, cubierta con malla negra de 50 % de sombreado, localizada en el rancho San Fernando, Municipio de La Paz, Baja California Sur, México, ubicado en las coordenadas 24°03'48" latitud norte y 110°24'37" longitud oeste, a una altitud de 36 msnm. La temperatura promedio durante el experimento fue de 24±5 °C. Cuatro sustratos fueron evaluados (Cuadro 1) en cuatro tipos de chiles: tres tipos de *Capsicum annuum* L.: húngaro, serrano y jalapeño, y un tipo de *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.: manzano.

altitude of 36 meters above sea level. The average temperature during the experiment was 24 ± 5 °C. Four substrates were evaluated (Table 1) in four types of chili peppers: three types of *Capsicum annuum* L.: Hungarian, Serrano and jalapeño, and one type of *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.: Manzano.

The treatments were established under a completely randomized design with six repetitions, of which four were considered for measurement of variables. The experimental unit consisted of a black polyethylene pot with a volume of eight liters filled with seven liters of substrate, into

### Cuadro 1. Descripción de los sustratos evaluados en el experimento.

**Table 1. Description of the substrate evaluated in the experiment.**

Sustratos	Descripción
1	Suelo (Franco-arenoso, pH 8,24, conductividad eléctrica (CE) 1,32 dS.m <sup>-1</sup> ; materia orgánica 0,17 %).
2	Arena (Tamaño de partículas de arena entre 0,063-2,00 mm).
3	Arena-Perlita (Relación 4:1) (Tamaño de partículas de perlita entre 1,5-2,3 mm).
4	Arena-Perlita (Relación 1,5:1)

Los tratamientos se establecieron bajo un diseño completamente al azar con seis repeticiones, de las cuales se consideraron cuatro para medición de variables. La unidad experimental consistió en una maceta de polietileno de color negro con volumen de ocho litros rellena con siete litros de sustrato, en la cual se trasplantó una plántula de cuatro semanas de edad. La nutrición de las plantas se llevó a cabo mediante la aplicación de 0,9 L.dia<sup>-1</sup> de la solución nutritiva: N: 68, P: 60, K: 67, Ca: 55 y Mg: 35 mg.L<sup>-1</sup>, pH 5,8 y CE 2,5 dS.m<sup>-1</sup>. Las

which a four-week-old seedling was transplanted. The nutrition of the plants was carried out by applying 0.9 L.day<sup>-1</sup> of the nutrient solution: N: 68, P: 60, K: 67, Ca: 55 and Mg: 35 mg.L<sup>-1</sup>, pH 5.8 and EC 2.5 dS.m<sup>-1</sup>. The variables evaluated were stem diameter, plant height, root dry weight and aerial part dry weight, which were measured at the beginning of flowering, being 50 days after transplantation (ddt) for *C. annuum* types and the 100 ddt for *C. pubescens*. For the variables of height and stem diameter, a flexometer and

variables evaluadas fueron diámetro del tallo, altura de planta, peso seco de raíz y peso seco de parte aérea, las cuales se midieron al inicio de floración, siendo a los 50 días después del trasplante (ddt) para los tipos *C. annuum* y a los 100 ddt para *C. pubescens*. Para las variables de altura y diámetro de tallo se utilizó flexómetro y vernier digital, respectivamente; para determinar la biomasa seca las muestras se secaron en estufa de aire forzado a 60 °C por 48 horas y se pesaron en una balanza analítica con precisión de 0,001 g. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza mediante el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 22,0 (IBM Corp, 2013). Un análisis de contrastes ortogonales se utilizó para evaluar tres hipótesis respecto a los sustratos: 1) Ho: suelo = sustratos, 2) Ho: arena = arena-perlita, y 3) Ho: arena-perlita (4:1) = arena-perlita (1,5:1).

## Resultados y discusión

El análisis de contrastes ortogonales mostró que los materiales evaluados provocaron diferencias estadísticas en el crecimiento (Cuadro 2).

Las plantas de chile húngaro cultivadas en medios diferentes al suelo mostraron un incremento de 17 % en el diámetro de tallo. A pesar de que los sustratos con arena no fueron estadísticamente diferentes, en la mezcla 4:1 los tallos presentaron 10 % mayor diámetro que en la mezcla 1,5:1. La altura de plantas cultivadas en sustrato con arena mostraron un incremento de 17 % comparado con el

digital vernier were used, respectively; To determine the dry biomass, the samples were dried in a forced air oven at 60 °C for 48 hours and weighed on an analytical balance with a precision of 0.001 g. The data obtained were subjected to an analysis of variance using the statistical package Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 22.0 (IBM Corp, 2013). An orthogonal contrast analysis was used to evaluate three hypotheses regarding substrates: 1) Ho: soil = substrates, 2) Ho: sand = sand-perlite, and 3) Ho: sand-perlite (4:1) = sand- perlite (1.5:1).

## Results and discussion

The orthogonal contrast analysis showed that the evaluated materials caused statistical differences in growth (Table 2).

Hungarian chili plants grown in media other than soil showed a 17 % increase in stem diameter. Although the substrates with sand were not statistically different, in the 4:1 mixture the stems had 10 % greater diameter than in the 1.5:1 mixture. The height of plants grown in sand substrate showed an increase of 17 % compared to the soil. The root dry weight of plants grown in substrate showed values higher than the soil in 148 %; while the sand-perlite substrates were superior to sand by 49 %, and particularly the sand-perlite mixture 4:1 was superior to the 1.5:1 mixture by 78 %. In the dry weight of the aerial part, the sand-based materials were 58 % higher than the soil. Although there were no

suelo. El peso seco de raíz de plantas cultivadas en sustrato mostró valores superiores al suelo en 148 %; mientras que los sustratos arena-perlita fueron superiores a la arena en 49 %, y particularmente la mezcla arena-perlita 4:1 fue superior a la mezcla 1,5:1 en 78 %. En el peso seco de la parte aérea los materiales a base de arena fueron superiores al suelo en 58 %. A pesar de que no hubo diferencias entre la arena y el promedio de las mezclas arena-perlita, la mezcla 4:1 fue superior a la mezcla 1,5:1 en 37 % (Cuadro 3).

differences between the sand and the average of the sand-perlite mixtures, the 4:1 mixture was superior to the 1.5:1 mixture in 37 % (Table 3).

The stem diameter of serrano plants grown in sand and sand-perlite showed an increase of 6 % compared to those grown in soil. Between sand and sand-perlite mixtures, sand outperformed mixtures by 14 %, while, in the comparison between mixtures, sand-perlite 4:1 was 10 % superior to the 1.5:1 mixture. The height of the plants grown in the sand-perlite mixtures were higher than the sand

**Cuadro 2. Resultados de los contrastes ortogonales en el efecto de los sustratos sobre el crecimiento de chiles húngaro, serrano y jalapeño (*Capsicum annuum* L.), y manzano (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.).**

**Table 2. Results of orthogonal contrasts in the effect of substrates on the growth of chili peppers: húngaro, serrano y jalapeño (*Capsicum annuum* L.), y manzano (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.).**

Chile	Contraste	Sustratos				Variables			
		1	2	3	4	Diámetro de tallo	Altura de planta	Peso seco raíz	Peso seco parte aérea
Húngaro	C1	3	-1	-1	-1	**	*	**	**
	C2	0	2	-1	-1	ns	ns	**	ns
	C3	0	0	1	-1	*	ns	**	**
Serrano	C1	3	-1	-1	-1	*	ns	*	ns
	C2	0	2	-1	-1	**	*	ns	ns
	C3	0	0	1	-1	*	ns	ns	ns
Jalapeño	C1	3	-1	-1	-1	*	ns	**	**
	C2	0	2	-1	-1	ns	*	*	ns
	C3	0	0	1	-1	ns	ns	*	ns
Manzano	C1	3	-1	-1	-1	*	ns	**	**
	C2	0	2	-1	-1	ns	*	**	ns
	C3	0	0	1	-1	ns	ns	*	ns

\*\*= altamente significativo p<0,01, \* = significativo p<0,05, ns= no significativo.

\*\*= highly significant p<0.01, \* = significant p<0.05, ns= not significant.

El diámetro de tallo de plantas de serrano cultivadas en arena y arena-perlita mostraron un incremento de 6 % comparadas con las cultivadas en suelo. Entre la arena y las mezclas arena-perlita, la arena superó a las mezclas en 14 %, mientras que, en la comparación entre las mezclas, la arena-perlita 4:1 fue superior en 10 % a la mezcla 1,5:1. La altura de las plantas cultivadas en las mezclas arena-perlita fueron superiores a la arena en 16 %. El peso seco de la raíz fue beneficiado por los materiales con arena, incrementándose en 35 % (Cuadro 3).

Las plantas de chile jalapeño y manzano cultivadas en materiales con arena mostraron un incremento del diámetro de tallo de 19 y 13 %, respectivamente. A pesar de que la altura de las plantas cultivadas fue similar en todos los materiales, las mezclas arena-perlita, en comparación con la arena, mostraron un incremento de 20 y 10 % en chiles jalapeño y manzano, respectivamente. Los materiales a base de arena incrementaron el peso seco de raíz de jalapeño en 153 % y manzano en 86 %; las mezclas arena-perlita fueron superiores a la arena en 28 y 48 %, mientras que la mezcla arena-perlita 1,5:1 fue superior a la mezcla 4:1 en 29 y 17 %, para jalapeño y manzano, respectivamente. El peso seco de la parte aérea de las plantas de jalapeño mostró un incremento de 66 %, mientras que las plantas de chile manzano mostraron un incremento de 20 % cuando las plantas fueron cultivadas en los tratamientos con arena (Cuadro 3).

by 16 %. The dry weight of the root was benefited by the materials with sand, increasing by 35 % (Table 3).

The jalapeño pepper and apple tree plants grown in sand materials showed an increase in stem diameter of 19 and 13 %, respectively. Despite the fact that the height of the cultivated plants was similar in all materials, the sand-perlite mixtures, in comparison with the sand, showed an increase of 20 and 10 % in jalapeño and manzano peppers, respectively. Sand-based materials increased jalapeño root dry weight by 153 % and apple tree by 86 %; the sand-perlite mixtures were superior to the sand in 28 and 48 %, while the sand-perlite mixture 1.5:1 was superior to the 4:1 mixture in 29 and 17 %, for jalapeño and apple tree, respectively. The dry weight of the aerial part of the jalapeño plants showed an increase of 66 %, while the manzano chili plants showed an increase of 20 % when the plants were cultivated in the sand treatments (Table 3).

Sand-based substrates have proven to be a viable option for agricultural production, as shown by sand-vermicompost mixtures (1:1, v/v) which provided better conditions for the growth of Hungarian chili (Moreno-Reséndez *et al.*, 2014), as well as the sand-vermicompost mixture (4:1, v/v) which benefited the growth of six varieties of jalapeño pepper (Beltrán-Morales *et al.*, 2016). The greater growth of cultivated plants in sand-based substrates is attributed to the fact that sand allows the growth of roots through large pores (> 5 mm), mainly (Othman *et al.*, 2019).

**Cuadro 3. Efecto de los sustratos en el crecimiento de chiles húngaro, serrano y jalapeño (*Capsicum annuum* L.), y manzano (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.).**

**Table 3. Effect of substrates on the growth of chili peppers húngaro, serrano y jalapeño (*Capsicum annuum* L.), y manzano (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.).**

Chile	Sustratos	Diámetro de tallo (mm)	Altura de planta (cm)	Peso seco raíz (g)	Peso seco parte aérea (g)
<b>Húngaro</b>	1) Suelo	9,000	66,167	2,110	12,143
	2) Arena	10,667	75,167	3,930	17,807
	3) Arena-Perlita (4:1)	11,000	76,333	7,477	23,617
	4) Arena-Perlita (1,5:1)	10,000	80,167	4,197	17,247
	±EE	0,279	3,681	0,431	1,297
<b>Serrano</b>	1) Suelo	10,333	110,667	3,610	17,903
	2) Arena	12,000	89,667	4,900	12,590
	3) Arena-Perlita (4:1)	11,000	107,000	5,107	19,190
	4) Arena-Perlita (1,5:1)	10,000	101,333	5,147	15,343
	±EE	0,211	5,660	0,527	2,007
<b>Jalapeño</b>	1) Suelo	10,000	94,000	3,240	14,360
	2) Arena	12,000	85,000	6,917	21,450
	3) Arena-Perlita (4:1)	12,333	110,000	7,760	24,380
	4) Arena-Perlita (1,5:1)	11,333	94,667	9,987	25,830
	±EE	0,506	5,420	0,696	1,839
<b>Manzano</b>	1) Suelo	9,667	76,000	8,243	22,563
	2) Arena	10,500	70,333	11,653	25,690
	3) Arena-Perlita (4:1)	11,333	75,667	15,870	26,723
	4) Arena-Perlita (1,5:1)	10,833	78,333	18,537	28,607
	±EE	0,428	2,483	0,878	1,340

Los valores representan la media de cuatro repeticiones. EE: error estándar de la media.

Values represent the mean of four replicates. EE: standard error mean.

Los sustratos a base de arena han mostrado ser una opción viable para la producción agrícola, tal y como lo demuestran las mezclas de arena-vermicomposta (1:1, v/v) la cual brindó mejores condiciones para el crecimiento de chile húngaro (Moreno-Reséndez *et al.*, 2014), así como la

Substrates with very small particles (<1 mm), have low oxygenation which affects a decrease in the absorption of water and nutrients, decreasing the growth and yield of the plants (Pire and Pereira, 2018). In particular, the mixture of perlite with sand allows a balance between pore size to be

mezcla arena-vermicomposta (4:1, v/v) la cual benefició el crecimiento de seis variedades de chile jalapeño (Beltrán-Morales *et al.*, 2016). El mayor crecimiento de plantas cultivadas en sustratos a base de arena se atribuye a que la arena permite el crecimiento de las raíces a través de los poros grandes (>5 mm), principalmente (Othman *et al.*, 2019). Sustratos con partículas muy pequeñas (<1 mm), tienen baja oxigenación lo que repercute en una disminución en la absorción de agua y nutrientes, disminuyendo el crecimiento y rendimiento de las plantas (Pire y Pereira, 2018). Particularmente la mezcla de perlita con arena permite mantener un equilibrio entre el tamaño de poros lo que permite la retención de humedad y la aeración, beneficiando el crecimiento de las plantas (Marksoska *et al.*, 2018). Los resultados de esta investigación reafirman lo reportado por los autores antes mencionados, quienes concluyen que las mezclas de arena con otros sustratos resultan en mejores condiciones para el crecimiento de las plantas.

## Conclusiones

Las mezclas de arena-perlita benefician el crecimiento de los chiles. Particularmente para chiles tipo húngaro y serrano la mezcla de arena-perlita 4:1 incrementa su crecimiento, mientras que para los chiles tipos jalapeño y manzano la mezcla arena-perlita 1,5:1 brinda mejores condiciones de crecimiento. Las mezclas arena-perlita deben ser consideradas como una alternativa de

mantenido, lo que permite la retención de humedad y la aeración, beneficiando el crecimiento de las plantas (Marksoska *et al.*, 2018). Los resultados de esta investigación reafirman lo reportado por los autores antes mencionados, quienes concluyen que las mezclas de arena con otros sustratos resultan en mejores condiciones para el crecimiento de las plantas.

## Conclusions

Sand-perlite mixtures benefit the growth of chili peppers. Particularly for Hungarian and Serrano chili peppers, the 4:1 sand-perlite mix increases their growth, while for jalapeño and apple chili peppers the 1.5:1 sand-perlite mix provides better growing conditions. Sand-perlite mixtures should be considered as a substrate alternative for the production of chili peppers in containers.

---

### *End of English Version*

---

sustrato para la producción de chiles en contenedor.

## Literatura citada

- Beltrán-Morales, F.A., J.L. García-Hernández, F.H. Ruiz-Espinoza, R.D. Valdez-Cepeda, P. Preciado-Rangel, M. Fortis-Hernández y A. González-Zamora. 2016. Efecto de sustratos orgánicos en el crecimiento de seis variedades de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.). Ecosistemas y recursos agropecuarios. 3(7):143-149.
- Cruz-Crespo, E., A. Can-Chulim, R. Bugarín-Montoya, J. Pineda-Pineda, R. Flores-Canales, P. Juárez-López y G. Alejo-Santiago. 2014. Concentración nutrimental foliar y crecimiento de



chile serrano en función de la solución nutritiva y el sustrato. Rev. Fitotec. Mex. 37(3):289-295.

García-Gaytán, V., F.C. Gómez-Merino, L.I. Trejo-Téllez, G.A. Baca-Castillo y S. García-Morales. 2017. The Chilhuacle chili (*Capsicum annuum* L.) in Mexico: Description of the Variety, Its Cultivation, and Uses. Int. J. Agron. 5:1-13.

Ghehsareh, A.M. y M. Kalbasi. 2012. Effect of addition of organic and inorganic combinations to soil on growing property of greenhouse cucumber. Afr. J. Biotechnol. 11(37):9102-9107.

Hasan, M.J., M.U. Kulsum, M.Z. Ullah, M.M. Hossain y M.E. Mahmud. 2014. Genetic diversity of some chili (*Capsicum annuum* L.) genotypes. Int. J. Agril. Res. Innov. Tech. 4(1):32-35.

IBM Corp. 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22. IBM Corp., Armonk, NY.

Jerca, I.O., S.M. Cimpeanu, G. Dudu and D.V. Bhurgila. 2015. Study on the influence of the type of substrate and the quantity upon the tomato crop. Sci. Papers Ser. B Hortic. 59:225-228.

Kopittke, P.M., N.W. Menzies, P. Wang, B.A. McKenna and E. Lombi. 2019. Soil and the intensification of agriculture for global food security. Environ. Int. 132: 105078.

Markoska, V., V. Spalevic and R. Gulaboski. 2018. A research on the influence of porosity on perlite substrate and its interaction on porosity of two types of soil and peat substrate. Journal of Agriculture and Plant Sciences. 64(3):15-29.

Moreno-Reséndez, A., N. Rodríguez-Dimas, J.L. Reyes-Carrillo, C. Márquez-Quiroz y J. Reyes-González. 2014. Comportamiento del chile húngaro (*Capsicum annuum*) en mezclas de vermicompost-arena bajo condiciones protegidas. Rev. FCA UNCUYO. 46(2):97-111.

Olaria, M., J.F. Nebot, H. Molina, P. Troncho, L. Lapeña and E. Llorens. 2016. Effect of different substrates for organic agriculture in seedling development of traditional species of Solanaceae. Span. J. Agric. Res. 14(1): e0801.

Olle, M., M. Ngouajio and A. Siomos. 2012. Vegetable quality and productivity as influenced by growing medium: a review. Zemdirbyste. 99(4):399-408.

Othman, Y., K. Bataineh, M. Al-Ajlouni, N. Alsmairat, J. Ayad, S. Shiyab and R. St Hilaire. 2019. Soilless culture; management of growing substrate, water, nutrient, salinity, microorganism and product quality. Fresenius Environ. Bull. 28:3249-3260.

Pire, R. y A. Pereira. 2018. Tamaño de los poros del suelo y crecimiento de raíz y vástago del chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.). Agrociencia. 52(5):685-693.




Wang, H.Y., J.C Han, W. Tong, J. Cheng and H.O. Zhang. 2016. Analysis of water and nitrogen use efficiency for maize (*Zea mays* L.) grown on soft rock and sand compound soil. J. Sci. Food. Agric. 97:2553-2560.

## Bacterias con actividad antifúngica asociadas a *Ocimum basilicum* L.

### *Ocimum basilicum* L. associated bacteria with antifungal activity

### *Ocimum basilicum* L. bactérias associadas com atividade antifúngica

Pablo Misael Arce-Amezquita<sup>1</sup>, Mirella Romero-Bastidas<sup>2</sup> y  
Maurilia Rojas-Contreras<sup>3\*</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: (PA) [parce@uabcs.mx](mailto:parce@uabcs.mx), , (MR) [miromero@uabcs.mx](mailto:miromero@uabcs.mx), , (MRC)  
[mrojas@uabcs.mx](mailto:mrojas@uabcs.mx), .

#### Resumen

La presencia de patógenos, como hongos, es una de las causas más importantes de pérdida de cultivos de albahaca en todo el mundo; sin embargo, muchos microorganismos tienen un papel crucial en el desarrollo de las plantas, incluida la protección contra los patógenos. En el presente estudio, se aislaron, cuantificaron y preservaron las bacterias predominantes asociadas a albahaca. La caracterización de las bacterias aisladas mostró 165 cepas Gram positivas, 152 con morfología bacilar y 13 con cocoide. Posteriormente, se realizaron ensayos de antagonismo *in vitro*, primero en contra *Aspergillus* spp. y posteriormente en contra de *Neoscytalidium dimidiatum*, *Alternaria*, spp. y *Aspergillus* spp. Finalmente, ensayos para evaluar el efecto de las bacterias aisladas sobre la germinación de semillas y las primeras etapas de desarrollo de albahaca fueron llevados cabo. Las plantas de albahaca muestreadas, producidas alrededor de La Paz, Baja California Sur, México, fueron colonizadas por bacterias antagonistas conocidas del género *Bacillus*. Las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* fueron las que presentaron de forma predominante la actividad antifúngica. Además, las cepas ALMH42, ALMR73 y ALAH91 no mostraron ningún efecto deletéreo sobre el desarrollo de las plántulas de albahaca. La exploración del potencial biotecnológico de estas cepas aisladas de plantas sanas de albahaca es de gran interés para futuras aplicaciones en este y otros cultivos.

Recibido: 04-04-2021 • Aceptado: 08-06-2021.

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [mrojas@uabcs.mx](mailto:mrojas@uabcs.mx)

**Palabras clave:** *Bacillus* spp., albahaca, *Aspergillus* spp., *Neoscytalidium dimidiatum*, *Alternaria* spp., bacteria antifúngica.

### Abstract

The presence of pathogens, like fungi, is one of the most important causes of basil crop loss around the world; however, many microorganisms have a crucial role on plant development including protection against pathogenic ones. In the present study, basil associated bacteria were isolated, quantified and preserved. Characterization of isolated bacteria showed 165 Gram positive strains, 152 with bacillary and 13 with coccoid morphology. Later, *in vitro* antagonism assays were performed, first against *Aspergillus* spp. and then against *Neoscytalidium dimidiatum*, *Alternaria* spp. and *Aspergillus* spp. Finally, the effect of the isolated bacteria on basil seed germination and first stages of development were carried out. Sampled basil plants, produced around La Paz, Baja California Sur, Mexico, were colonized by known antagonistic bacteria of the *Bacillus* genus. *Bacillus amyloliquefaciens* strains were the prevailing species with antifungal activity. Moreover, strains ALMH42, ALMR73 and ALAH91 did not show any deleterious effect on basil seedling development. Biotechnological potential exploration of these isolated strains from healthy basil plants is of great interest for future applications on this and other crops.

**Keywords:** *Bacillus* spp., basil, *Aspergillus* spp., *Neoscytalidium dimidiatum*, *Alternaria* spp., antifungal bacteria.

### Resumo

A presença de patógenos, como fungos, é uma das causas mais importantes de perda de lavouras de manjeriço em todo o mundo; entretanto, muitos microrganismos desempenham um papel crucial no desenvolvimento das plantas, incluindo proteção contra patógenos. No presente estudo, as bactérias associadas ao manjeriço predominantes foram isoladas, quantificadas e preservadas. A caracterização das bactérias isoladas mostrou 165 cepas Gram positivas, 152 com morfologia bacilar e 13 com cocóide. Posteriormente, foram realizados testes de antagonismo *in vitro*, primeiro contra *Aspergillus* spp. e mais tarde contra *Neoscytalidium dimidiatum*, *Alternaria*, spp. e *Aspergillus* spp. Por fim, foram realizados ensaios para avaliar o efeito das bactérias isoladas na germinação das sementes e nos estágios iniciais do desenvolvimento do manjeriço. As plantas de manjeriço amostradas, produzidas em torno de La Paz, Baja California Sur, México, foram colonizadas por bactérias antagonistas conhecidas do gênero *Bacillus*. As cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* foram aquelas que exibiram predominantemente atividade antifúngica. Além disso, as cepas ALMH42, ALMR73 e ALAH91 não apresentaram efeito deletério no desenvolvimento de mudas de manjeriço. A exploração do potencial biotecnológico dessas cepas isoladas de plantas saudáveis de manjeriço é de grande interesse para futuras aplicações nesta e em outras culturas.

**Palabras-chave:** *Bacillus* spp., Manjerição, *Aspergillus* spp., *Neoscytalidium dimidiatum*, *Alternaria* spp., Bactéria antifúngica.

## Introducción

La sanidad y productividad de las plantas están relacionadas con su microbiota, dominada principalmente por bacterias y hongos (Purahong *et al.*, 2018). Las interacciones entre plantas y microorganismos han estado presentes durante mucho tiempo en la evolución, ya que los microorganismos han ayudado a las plantas a lidiar con la falta de nutrientes, condiciones estresantes y patógenos (Smith *et al.*, 2015). El estudio de las bacterias asociadas a las plantas, su potencial antagonista en el control de patógenos y su efecto como promotores del crecimiento comprende la acción de varios géneros y especies de bacterias que pueden aislarse de la superficie de los tejidos vegetales u obtenerse del interior de la planta (Daungfu *et al.*, 2019). En México y en muchas otras partes del mundo, la albahaca (*Ocimum basilicum* L., Fam. Lamiaceae) es una hierba aromática de importancia económica. En Baja California Sur, México, la producción de albahaca dulce fue de aproximadamente 1.685 toneladas al final del ciclo 2019 (SIAP 2019). La variedad Nuffar fue la principal albahaca dulce cultivada en el estado. Esta planta se utiliza en la industria alimentaria y en la medicina tradicional (Gilardi *et al.*, 2013). Las plantas de albahaca albergan una microbiota distintiva responsable del crecimiento, la calidad y la salud a través del metabolismo microbiano y las interacciones con el hospedador

## Introduction

Plant's health and productivity have been linked to their microbiota dominated mainly by bacteria and fungi (Purahong *et al.*, 2018). Interactions between plants and microorganism have been present for a long time in evolution, since microorganisms have helped plants to deal with lack of nutrients, stressful conditions, and pathogens (Smith *et al.*, 2015). The study of plant-associated bacteria, their antagonistic potential in control of pathogens and their effect as growth promoters comprise the action of several genera and species of bacteria that can be isolated from the surface of plant tissues or obtained from within the plant (Daungfu *et al.*, 2019). In Mexico, and many other parts of the world, basil (*Ocimum basilicum* L., Fam. Lamiaceae) is an economically important aromatic herb. In Baja California Sur, Mexico, production of sweet basil was approximately 1,685 tons at the end of 2019 cycle (SIAP 2019). Nuffar variety was the main sweet basil grown in the state. This plant is used in the food industry and in traditional medicine (Gilardi *et al.*, 2013). Basil plants shelter a distinctive microbiota responsible for growth, quality and health via microbial metabolism and host interactions (Adamović *et al.*, 2015). However, successive cultivation in the same soil for a long time is known to be associated with changes in physicochemical

(Adamović *et al.*, 2015). Sin embargo, se sabe que el cultivo sucesivo en el mismo suelo durante mucho tiempo está asociado con cambios en las propiedades fisicoquímicas del suelo, lo que a su vez, proporciona condiciones que causan enfermedades por patógenos, lo que lleva a pérdidas devastadoras de rendimiento. En este estudio, el objetivo fue aislar e identificar bacterias asociadas a plantas sanas de albahaca de cultivos alrededor de La Paz, Baja California Sur, México, con la capacidad de inhibir el desarrollo de hongos patógenos sin afectar el desarrollo de las plántulas.

## Materiales y métodos

### Material vegetal y sitio experimental

Se tomaron muestras de plantas de albahaca de cultivos con condiciones agroecológicas similares dentro del área de La Paz, B.C.S. México. Se seleccionaron aleatoriamente por cultivo tres plantas adultas de albahaca, listas para la cosecha, aparentemente sanas, con partes aéreas intactas (hojas normales sin manchas ni alteraciones de color), tallos sin deformaciones, separadas al menos 50 metros entre sí. Las ubicaciones de los cultivos fueron: Pescadero (Pradera Escolar 23° 21' 56"N, 110° 10' 27"O) y Las Maravillas (23° 21' 43"N, 110° 11' 18"O), Todos Santos (Sueño Tropical 23° 31' 29"N, 110° 17' 15"O) y Los Planes (Cesar Cárdenas, 23° 57' 11"N, 109° 55' 50"O). La raíz, el tallo y las hojas de cada planta se separaron y se colocaron

properties of the ground, which in turn, provides conditions that cause diseases by pathogens, leading to devastating yield losses. In this study, the objective was to isolate and identify bacteria associated to healthy basil plants from crops around La Paz, Baja California Sur, Mexico, with the ability to inhibit pathogenic fungi development without affecting seedling development.

## Material and methods

### Plant material and experimental site

Samples of basil plants were taken from crops with similar agroecological conditions within the area of La Paz, B.C.S. México. Three adult basil plants, ready for harvest, apparently healthy, with intact aerial parts (normal leaves without spots or color alterations), stems without deformations, separated at least 50 meters one from each other, were randomly selected per crop. The crop locations were: Pescadero (Pradera Escolar 23° 21' 56"N, 110° 10' 27"W) and Las Maravillas (23° 21' 43"N, 110° 11' 18"W), Todos Santos (Sueño Tropical 23° 31' 29"N, 110° 17' 15"W) and Los Planes (Cesar Cárdenas, 23° 57' 11"N, 109° 55' 50"W). Root, stem and leaves of each plant were separated and placed in sterile plastic bags. Later, the samples were transported to the Laboratory where the microbiological analysis was carried out.

### Isolation of bacteria

To isolate predominant bacteria, two culture media were used. Standard

en bolsas de plástico estériles. Posteriormente, las muestras fueron transportadas al Laboratorio donde se realizó el análisis microbiológico.

### Aislamiento de bacterias

Para aislar las bacterias predominantes, se utilizaron dos medios de cultivo. Se utilizó agar para métodos estándar o agar de recuento en placa (SMA, DIFCO) para aislar las bacterias y se utilizó agar de Man Rogosa y Sharp (MRS, DIFCO) para aislar las bacterias del ácido láctico. Brevemente, se colocaron 10 g de raíz, tallo u hojas en 90 ml de solución salina tampón fosfato (PBS) ( $\text{NaCl}$  145 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,87 mM y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  6,95 mM, pH 7,2) y se trituraron con un homogeneizador de tejidos (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel) hasta obtener una suspensión. Se prepararon diluciones en serie y luego se extendieron 100  $\mu\text{l}$  de cada dilución en placas de Petri duplicadas que contenían: SMA y MRS, las placas se incubaron a 35 °C durante 24 h. Las bacterias de colonias predominantes y morfológicamente diferentes se cruzaron y purificaron en placas que contenían el mismo medio que la placa en la que crecieron primero. Las bacterias se caracterizaron mediante tinción de Gram y morfología celular bajo un microscopio de contraste de fase (Nikon Eclipse E-600), luego se inocularon en caldo de soya trípico (TSB, DIFCO), se incubaron durante la noche a la temperatura anterior y se conservaron con glicerol al 50 % a -80 °C. (Goldman y Green 2009). Las bacterias aisladas se etiquetaron de la siguiente manera: las dos primeras letras corresponden a la planta

methods agar or plate count agar (SMA, DIFCO) was used to isolate bacteria and de Man Rogosa and Sharp agar (MRS, DIFCO) was used to isolate lactic acid bacteria. Briefly, 10 g of root, stem or leaves were placed into 90 mL of phosphate buffer saline (PBS) (145 mM NaCl, 2.87 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 6.95 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.2) and triturated with a tissue homogenizer (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel) until a suspension was obtained. Serial dilutions were prepared and then 100  $\mu\text{L}$  of each dilution was spread on duplicated Petri dishes containing: SMA and MRS, the plates were incubated at 35 °C for 24 h. Bacteria from predominant and morphologically different colonies were cross streaked and purified onto plates containing the same media as the plate they grew first. Bacteria were characterized by Gram staining and cell morphology under a phase contrast microscope (Nikon Eclipse E-600), then inoculated in Tryptic Soy Broth (TSB, DIFCO) and incubated overnight at the above temperature and preserved with 50 % glycerol at -80 °C (Goldman and Green 2009). The isolated bacteria were labeled as follows: first two letters correspond to the investigated plant, in this case AL for basil; third letter corresponds to culture media they were isolated from, A for standard methods agar and M for de Man Rogosa and Sharpe medium. Fourth letter corresponds to the part of the plant sampled: R for root, T for stem and H for leaves. First number corresponds to the sampling area: 1-3 corresponds to Pescadero, 4-6 corresponds to Los Planes and 7-9

investigada, en este caso AL para albahaca; La tercera letra corresponde al medio de cultivo del que se aislaron, A para los métodos estándar de agar y M para el medio de Man Rogosa y Sharpe. La cuarta letra corresponde a la parte de la planta muestreada: R para raíz, T para tallo y H para hojas. El primer número corresponde al área de muestreo: 1-3 corresponde a Pescadero, 4-6 corresponde a Los Planes y 7-9 corresponde a Todos Santos. Finalmente, el último número corresponde a la colonia aislada.

### **Hongos modelo utilizados en ensayo antagonista**

Los hongos utilizados en este estudio fueron *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp. y *Hendersonula* spp. actualmente identificado como *Neoscytalidium dimidiatum*. *Aspergillus* spp. proviene de un cultivo monospórico aislado de suelo y caracterizado por su morfología colonial (macroscópica) y celular (microscópica) según claves taxonómicas generales en el Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos de esta Universidad. Este hongo se utilizó en esta investigación como modelo para realizar el primer cribado de bacterias con capacidad antagonista. *Alternaria* spp. y *N. dimidiatum* también provienen de un cultivo monospórico y fueron previamente aislados de *Ocimum basilicum* L. y *Ficus benjamina* respectivamente (Hernández-Montiel *et al.*, 2018). Estos hongos se utilizaron como modelo para importantes patógenos vegetales en esta región.

### **Ensayo antifúngico cualitativo**

La actividad antifúngica se detectó mediante una metodología

corresponde to Todos Santos. Finally, the last number corresponds to the isolated colony.

### **Model Fungi used in antagonistic assay**

The fungi used in this study were *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp. and *Hendersonula* spp. currently identified as *Neoscytalidium dimidiatum*. *Aspergillus* spp. comes from a monosporic culture isolated from soil and characterized by its colonial (macroscopic) and cellular (microscopic) morphology according to general taxonomic keys in the Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos at this University. This fungus was used in this research as a model to carry out the first screening of bacteria with antagonistic capacity. *Alternaria* spp. and *N. dimidiatum* also come from a monosporic culture and were previously isolated from *Ocimum basilicum* L. and *Ficus benjamina* respectively (Hernández-Montiel *et al.*, 2018). These fungi were used as a model for important plant pathogens in this region.

### **Qualitative antifungal assay**

The antifungal activity was detected using a methodology developed by our research group. The confrontation assays against *Aspergillus* spp. were carried out in a method previously described (Joo *et al.*, 2015), modified with dual culture plates containing a mixture of TSA and PDA at 1:1 ratio. The isolated and purified bacteria were inoculated at 1 % in TSB and incubated overnight at 30 °C, then 10 µL drop of the suspension was placed on each Petri dish at 15 mm away from the edge.

desarrollada por nuestro grupo de investigación. Los ensayos de confrontación contra *Aspergillus* spp. se llevaron a cabo mediante un método previamente descrito (Joo *et al.*, 2015), modificado con placas de cultivo dual conteniendo una mezcla de TSA y PDA en proporción 1: 1. Las bacterias aisladas y purificadas se inocularon al 1 % en TSB y se incubaron durante la noche a 30 °C, luego se colocaron gotas de 10 µL de la suspensión en cada placa de Petri a 15 mm del borde. Las placas se incubaron durante 24 ha 30 °C. Posteriormente, se impregnó un disco de papel de filtro de 4 mm de diámetro, humedecido con PBS, con esporas de *Aspergillus* spp. colonia cultivada durante 72 h a 30 °C en medio PDA, y luego colocada a 15 mm de la colonia de bacterias. Los cultivos duales, realizados por duplicado, se incubaron durante 72 h a 30 °C y luego se observaron las zonas de inhibición. Se utilizó como control positivo una placa de Petri inoculada únicamente con el disco que contenía el hongo.

### Ensayo antimicótico confirmatorio

El crecimiento de las bacterias que mostraron claramente una zona de inhibición de *Aspergillus* spp. se probó contra *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* y *Alternaria* spp. utilizando la metodología desarrollada por nuestro grupo de investigación. Las cepas bacterianas reactivadas en TSB se inocularon al 1 % en tubos con el mismo medio y se incubaron durante 24 ha 30 °C. Posteriormente, se centrifugaron a 3.500 rpm, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron los sedimentos en el mismo volumen

The dishes were incubated for 24 h at 30 °C. Subsequently, a 4 mm diameter filter paper disk, moistened with PBS was impregnated with spores of an *Aspergillus* spp. colony grown for 72 h at 30 °C in PDA medium, and then placed 15 mm away from the bacteria colony. The dual cultures, performed in duplicate, were incubated for 72 h at 30 °C and then inhibition zones were observed. A Petri dish inoculated only with the disc containing the fungus was used as positive control.

### Confirmatory antifungal assay

The growth of bacteria that clearly showed an inhibition zone of *Aspergillus* spp. were tested against *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* and *Alternaria* spp. using methodology developed by our research group. Bacterial strains reactivated in TSB were inoculated at 1 % in tubes with the same medium and incubated for 24 h at 30 °C. Subsequently, they were centrifuged at 3,500 rpm, the supernatant was decanted, and the pellets were resuspended in the same volume of PBS. Parallely, the fungi were cultivated in PDA for 72 h, its spores were collected, and its concentration was adjusted to 10<sup>6</sup> spores mL<sup>-1</sup> by direct count, under the microscope using a Neubauer plate. Then, 0.1 mL of the suspensions were spread onto TSA-PDA 1:1 Petri dishes. Later three 10 µL drops of each bacterial suspension were evenly distributed on the plate previously spread with a fungus. The plates were then incubated at 30 °C for 72 h. After the incubation time, the zone of inhibition was measured in millimeters. Two replicates were made



de PBS. Paralelamente, los hongos se cultivaron en PDA durante 72 h, se recolectaron sus esporas y se ajustó su concentración a 106 esporas mL<sup>-1</sup> por conteo directo, bajo el microscopio utilizando una placa Neubauer. Luego, se esparcieron 0,1 ml de las suspensiones sobre placas Petri TSA-PDA 1:1. Posteriormente se distribuyeron uniformemente tres gotas de 10 µL de cada suspensión bacteriana sobre la placa previamente esparcida con un hongo. A continuación, las placas se incubaron a 30 °C durante 72 h. Después del tiempo de incubación, se midió la zona de inhibición en milímetros. Se realizaron dos réplicas por tratamiento y el experimento se repitió dos veces. Se midieron las zonas de inhibición y se seleccionaron bacterias con grandes zonas de inhibición (más de 10 mm) para la identificación molecular.

### Identificación molecular

Las bacterias se identificaron mediante secuenciación del gen 16S rDNA. El ADN total se extrajo siguiendo las recomendaciones de los fabricantes (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega Corporation). La PCR se llevó a cabo utilizando cebadores universales pA (directo): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y pH (inverso): 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' siguiendo el método de Broda *et al.* (1999). Los amplicones se purificaron y luego se secuenciaron. Los datos obtenidos se procesaron mediante búsquedas BLAST en el NCBI y se cargaron en la base de datos de GenBank.

per treatment and the experiment was repeated twice. Inhibition zones were measured and bacteria with large inhibition zones (more than 10 mm) were selected for molecular identification.

### Molecular identification

Bacteria were identified by 16S rDNA gene sequencing. Total DNA was extracted following manufacturers recommendation (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega Corporation). PCR was carried out using universal primers pA (forward): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and pH (reverse): 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' following Broda *et al.* (1999) method. The amplicons were purified and then sequenced. The obtained data was processed using BLAST searches in the NCBI and uploaded to GenBank database.

### Germination test

Microtubes were filled with one hundred twenty basil seeds. The seeds were disinfected with a 4.25 % aqueous sodium hypochlorite solution for 2 minutes, rinsed with sterile distilled water three times. Then seeds were inoculated with the suspension of bacteria that presented antifungal activity against *Aspergillus* spp. containing 10<sup>6</sup> CFU.mL<sup>-1</sup> and let stand for two minutes. The supernatant was decanted, and the seeds were set in a completely random design which consisted of four replicates of 30 seeds per treatment and controls. The seeds were placed in Petri dishes with a filter paper covering the bottom of the plate. Water was added to moisten the seeds and then let stand for 5 days in

### Prueba de germinación

Los microtubos se llenaron con ciento veinte semillas de albahaca. Las semillas se desinfectaron con una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 4,25 % durante 2 minutos, se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces. Luego se inocularon semillas con la suspensión de bacterias que presentaban actividad antifúngica contra *Aspergillus* spp. que contiene 106 CFU.mL<sup>-1</sup> y se dejó reposar durante dos minutos. Se decantó el sobrenadante y las semillas se distribuyeron en un diseño completamente aleatorio que consistió en cuatro repeticiones de 30 semillas por tratamiento y controles. Las semillas se colocaron en placas de Petri con un papel de filtro que cubría el fondo de la placa. Se añadió agua para humedecer las semillas y luego se dejó reposar durante 5 días en la oscuridad en una cámara de germinación a 25 °C. La rotura de la testa se consideró como indicación de germinación. Las plántulas de cinco días se separaron mediante hipocótilo y radícula, la longitud de todas las plántulas se midió con el software RootNav (Pound *et al.*, 2013), luego se secaron y pesaron para obtener biomasa seca. La significancia de los resultados obtenidos se analizó mediante análisis de varianza univariante (ANOVA), se utilizó como factor fijo la inoculación de semillas con diferentes bacterias. La diferencia entre las medias se determinó mediante la prueba de Tukey de rango múltiple HSD en  $p = 0,05$ . Los valores medios se consideraron significativamente diferentes cuando  $p \leq 0,05$ . El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software SAS (Statistical Analysis System (SAS), SAS University Edition).

the dark in a germination chamber at 25 °C. Testa rupture was considered as indication of germination. Five days old seedlings were separated out by hypocotyl and radicle, length of all seedlings was measured by the software RootNav (Pound *et al.*, 2013), then dried and weighted to obtain dry biomass. The significance of the obtained results was analyzed by one-way univariate analysis of variance (ANOVA), seed inoculation with different bacteria was used as a fixed factor. The difference between the means was determined by Tukey's test HSD multiple range test at  $p = 0.05$ . Mean values were considered significantly different when  $p \leq 0.05$ . Statistical analysis was carried out using SAS software (Statistical Analysis System (SAS) software, SAS University Edition).

### Results and discussion

The microbiological status of healthy basil plants should be determined by the growing conditions, the environment of the region, the method of cultivation and the associated beneficial microbiota at any stage of their production process. In this study a total of 165 isolates were obtained from the predominant microbiota of different parts of the sampled apparently healthy basil plants from different sites. Ninety-four isolates were from SMA and 71 from MRS media used in the microbiological analysis, all of them were Gram positive, 152 with bacillary and 13 with coccoid morphology.

## Resultados y discusión

El estado microbiológico de las plantas de albahaca sanas debe estar determinado por las condiciones de crecimiento, el medio ambiente de la región, el método de cultivo y la microbiota beneficiosa asociada en cualquier etapa de su proceso de producción. En este estudio se obtuvo un total de 165 aislamientos de la microbiota predominante de diferentes partes de las plantas de albahaca aparentemente sanas muestreadas en diferentes sitios. Noventa y cuatro aislamientos fueron de SMA y 71 de medios MRS utilizados en el análisis microbiológico, todos fueron grampositivos, 152 con morfología bacilar y 13 con morfología cocoide. Entre las bacterias colonizadoras de plantas más comunes se encuentran las del género *Bacillus* (Moffat, 2001). Se sabe que la resistencia sistémica inducida es desencadenada por miembros beneficiosos del microbioma de la raíz en una amplia gama de plantas hospedantes, lo que las hace resistentes contra diversas amenazas patógenas. Esta mejora sistémica también se ha descrito para muchas bacterias promotoras del crecimiento de plantas del género *Bacillus* (Pieterse *et al.*, 2014). Es bien sabido que las bacterias del género *Bacillus* tienen la capacidad de producir una serie de compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana (Raaijmakers, 2010).

El ensayo de confrontación cualitativa de 165 aislamientos contra *Aspergillus* spp. resultó en 15 cepas de bacilos que inhibieron el crecimiento del hongo en diferentes grados (figura 1). Se aislaron cepas antagonistas de la

Among the most common plant colonizing bacteria, we can find those of the *Bacillus* genus (Moffat, 2001). It is known that induced systemic resistance is triggered by beneficial members of the root microbiome in a wide range of plant hosts making them resistant against various pathogenic threats. This systemic enhancement has also been described for many plant growth-promoting bacteria of the *Bacillus* genus (Pieterse *et al.*, 2014). It is well known that bacteria of the *Bacillus* genus have the capability of producing a series of bioactive compounds with antimicrobial activity (Raaijmakers, 2010).

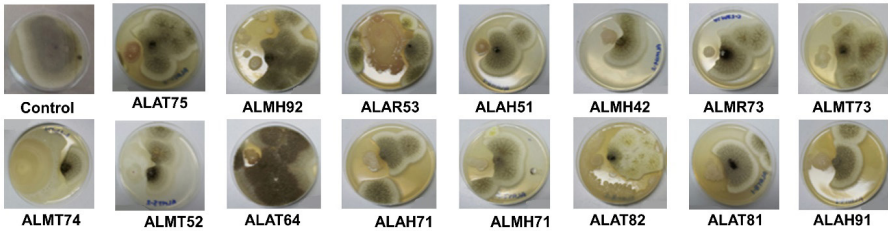
The qualitative confrontation assay of the 165 isolates against *Aspergillus* spp. resulted in 15 bacilli strains that inhibited the growth of the fungus at different degrees (figure 1). Antagonistic strains were isolated from aerial part of plants collected in the towns of Los Planes and Todos Santos. It is known that conditions on the plant leaves and stem (aerial part) are harsh for bacteria resulting in local microsites at which conditions are favorable for growth and/or survival (Jacobs *et al.*, 2005).

The confirmative confrontation assay against *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* and *Alternaria* spp., performed with the fifteen bacterial strains that showed antagonistic activity, confirmed the growth inhibition of fungi by some of them. Bacterial strains presented non regular inhibition zones on fungi growth; therefore, length and width measurements of the inhibition area were documented (table 1). This

parte aérea de plantas recolectadas en las localidades de Los Planes y Todos Santos. Se sabe que las condiciones en las hojas y el tallo de la planta (parte aérea) son adversas para las bacterias, lo que da como resultado micrositios locales en los que las condiciones son favorables para el crecimiento y/o la supervivencia (Jacobs *et al.*, 2005).

behavior was observed because some bacteria are highly mobile.

Results of the molecular identification of bacteria with confirmed antifungal activity, showed that all of them belong to the *Bacillus* genus according to BLAST similarity analysis (table 2). *Bacillus* isolates like *B. subtilis*, *B. methylotrophicus*



**Figura 1. Ensayo cualitativo de bacterias aisladas con actividad antagonista frente a *Aspergillus* spp. en placas de Petri TSA-PDA 50/50 después de una incubación de 72 h a 30 °C.**

**Figure 1. Qualitative test of isolated bacteria with antagonistic activity against *Aspergillus* spp. on TSA-PDA 50/50 Petri dishes after incubation for 72 h at 30 °C.**

El ensayo de confrontación confirmativa contra *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* y *Alternaria* spp., realizado con las quince cepas bacterianas que mostraron actividad antagonista, confirmó la inhibición del crecimiento de hongos por algunas de ellas. Las cepas bacterianas presentaron zonas de inhibición no regulares sobre el crecimiento de hongos; por lo tanto, se documentaron las medidas de largo y ancho del área de inhibición (cuadro 1). Este comportamiento se observó porque algunas bacterias son muy móviles.

and *B. amyloliquefaciens* have been shown to have antagonistic activity against common plant pathogenic fungi. These bacteria species have been considered efficient colonizers that are widely spread due to their capacity to form spores, to grow in a wide range of temperatures and to produce antibiotic compounds that inhibit phytopathogens growth, besides being plant growth promoters (Rios-Velasco *et al.*, 2016).

In this investigation eight strains with antifungal activity against *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* and/or *Alternaria* spp., found in the samples obtained from basil plants,

**Cuadro 1. *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* y *Alternaria* spp. zonas de inhibición del crecimiento generadas por cepas bacterianas con actividad antifúngica confirmada.**

**Table 1. *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* and *Alternaria* spp. growth inhibition zones generated by bacterial strains with confirmed antifungal activity.**

Strain ID	<i>Aspergillus</i> spp.		<i>N. dimidiatum</i>		<i>Alternaria</i> spp.	
	Length inhibition zone (mm)	Width inhibition zone (mm)	Length inhibition zone (mm)	Width inhibition zone (mm)	Length inhibition zone (mm)	Width inhibition zone (mm)
ALMH42	< 10	< 10	28	28	< 10	< 10
ALMR73	< 10	< 10	< 10	< 10	31	25
ALMT73	23	18	30	31	28	26
ALAH71	< 10	< 10	< 10	< 10	30	31
ALAT82	< 10	< 10	< 10	< 10	30	26
ALAT81	< 10	< 10	30	26	28	24
ALAH91	< 10	< 10	30	30	< 10	< 10
ALAT75	< 10	< 10	23	27	< 10	< 10

Los resultados de la identificación molecular de bacterias con actividad antifúngica confirmada, mostraron que todas ellas pertenecen al género *Bacillus* según el análisis de similitud BLAST (cuadro 2). Se ha demostrado que aislados de *Bacillus* como *B. subtilis*, *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens* tienen actividad antagonista contra hongos patógenos de plantas comunes. Estas especies de bacterias han sido consideradas colonizadoras eficientes y ampliamente diseminadas debido a su capacidad para formar esporas, crecer en un amplio rango de temperaturas y producir compuestos antibióticos que inhiben el crecimiento de fitopatógenos, además de ser promotores del crecimiento vegetal (Rios-Velasco *et al.*, 2016).

were identified and six of them belong to *B. amyloliquefaciens*. This is a microorganism that grows mainly in the rhizosphere, it begins to grow close to the formation point of lateral roots and it spreads on the root surface (Lugtenberg and Kamilova, 2005). Nowadays, it has been demonstrated that inoculation of crops with *B. amyloliquefaciens* strains could increase production under stressful conditions like nutrient limitations or high salinity levels (Kim *et al.*, 2017). It also has been observed that it could help to control other pathogens either by competing for nutrients or by producing antibiotics and lytic enzymes; particularly, the molecular basis of its plant growth-promoting activity is mainly based on the production of secondary

**Cuadro 2. Identificación molecular de bacterias aisladas de plantas de albahaca aparentemente sanas que presentaron actividad antifúngica.****Table 2. Molecular identification of isolated bacteria from apparently healthy plants of basil which present antifungal activity.**

Isolated strain	Molecular identification	Place of origin	Part of the plant	Access # GenBank
ALMH42	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Cesar Cárdenas, Los Planes	Leaves	MT940837
ALMR73	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Sueño Tropical, Todos Santos	Root	MT940838
ALMT73	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Sueño Tropical, Todos Santos	Stem	MT940839
ALAH71	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Sueño Tropical, Todos Santos	Leaves	MT940840
ALAT82	<i>Bacillus velezensis</i>	Sueño Tropical, Todos Santos	Stem	MT940841
ALAT81	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Sueño Tropical, Todos Santos	Stem	MT940848
ALAH91	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Sueño Tropical, Todos Santos	Leaves	MT940842
ALAT75	<i>Bacillus subtilis</i>	Sueño Tropical, Todos Santos	Stem	MT940843

En esta investigación se identificaron ocho cepas con actividad antifúngica contra *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* y/o *Alternaria* spp., encontradas en las muestras obtenidas de plantas de albahaca, y seis de ellas pertenecen a *B. amyloliquefaciens*. Este es un microorganismo que crece principalmente en la rizosfera, comienza a crecer cerca del punto de formación de las raíces laterales y se disemina sobre la superficie de la raíz (Lugtenberg y Kamilova, 2005). En la actualidad, se ha demostrado que la

metabolites suppressing competitive microbial pathogens occurring in the plant rhizosphere, secretion of the plant growth hormone auxin and the synthesis of volatiles stimulating plant growth and induced systemic resistance (Chen *et al.*, 2009). In addition, some *B. amyloliquefaciens* strains could decrease the incidence of nematodes in some cultivars (Liu *et al.*, 2013). Other species found with antagonistic activity against fungi were *B. velezensis* and *B. subtilis*, members of the *Bacillus* genus as well and

inoculación de cultivos con cepas de *B. amyloliquefaciens* podría aumentar la producción en condiciones estresantes como limitaciones de nutrientes o altos niveles de salinidad (Kim *et al.*, 2017). También se ha observado que podría ayudar a controlar otros patógenos, ya sea compitiendo por los nutrientes o produciendo antibióticos y enzimas líticas; particularmente, la base molecular de su actividad promotora del crecimiento vegetal se basa principalmente en la producción de metabolitos secundarios que suprimen los patógenos microbianos competitivos que se encuentran en la rizosfera de las plantas, la secreción de la hormona del crecimiento vegetal auxina y la síntesis de volátiles que estimulan el crecimiento de las plantas y la resistencia sistémica inducida (Chen *et al.*, 2009). Además, algunas cepas de *B. amyloliquefaciens* podrían disminuir la incidencia de nematodos en algunos cultivares (Liu *et al.*, 2013). Otras especies encontradas con actividad antagonista contra los hongos fueron *B. velezensis* y *B. subtilis*, miembros del género *Bacillus* también y estrechamente relacionados con *B. amyloliquefaciens* (Rabbee *et al.*, 2019). Además, se ha demostrado que la colonización microbiana tiene un impacto importante en la calidad de la albahaca dulce, especialmente en la acumulación de importantes metabolitos secundarios como el aceite esencial (Banchio *et al.*, 2009). Esta capacidad excepcional es de gran importancia cuando interesa la producción de productos de alta calidad.

closely related to *B. amyloliquefaciens* (Rabbee *et al.*, 2019). Also, it has been shown that microbial colonization has an important impact on sweet basil quality, especially on accumulation of important secondary metabolites like essential oil (Banchio *et al.*, 2009). This outstanding ability is of great importance when production of high-quality products is of interest.

Strains with observed antagonistic effect against *Aspergillus* spp. were used in a germination experiment to determine the effect of the bacteria on total germination, length, and biomass production of basil seedlings. The total seed germination reached between 80 and 90 %. Figure 2 shows that all tested bacteria had no significant difference on total germination of basil seeds as compared to the control. Other reports regarding *Capsicum annuum* seed treatment with *B. amyloliquefaciens* resulted in maximum enhancement of seed germination (84.75 %), seedling vigor (1,423.8) along with an increase in vegetative growth parameters (Gowtham *et al.*, 2018). Recently, a culture-independent next-generation sequencing-based approach was applied to investigate the beneficial impact of *B. amyloliquefaciens* L-S60 on the composition and dynamics of rhizosphere microbiota, and growth conditions of cucumbers during plug seedling. Application of L-S60 significantly altered the structure of the bacterial community associated with the cucumber seedling. Presence of beneficial rhizosphere species such as *Bacillus*, *Rhodanobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Nonomuraea*, and *Agrobacterium* was

Cepas con efecto antagonista observado contra *Aspergillus* spp. se utilizaron en un experimento de germinación para determinar el efecto de las bacterias sobre la germinación total, la longitud y la producción de biomasa de las plántulas de albahaca. La germinación total de la semilla alcanzó entre el 80 y el 90 %. La Figura 2 muestra que todas las bacterias probadas no presentaron diferencias significativas en la germinación total de semillas de albahaca en comparación con el control. Otros informes sobre el tratamiento de semillas de *Capsicum annuum* con *B. amyloliquefaciens* dieron como resultado un aumento máximo de la germinación de las semillas (84,75 %), el vigor de las plántulas (1.423,8) junto con un aumento de los parámetros de crecimiento vegetativo (Gowtham *et al.*, 2018). Recientemente, se aplicó un enfoque basado en secuenciación de próxima generación independiente del cultivo para investigar el impacto beneficioso de *B. amyloliquefaciens* L-S60 en la composición y dinámica de la microbiota de la rizosfera y las condiciones de crecimiento de los pepinos durante la plántula en cepellón. La aplicación de L-S60 alteró significativamente la estructura de la comunidad bacteriana asociada con la plántula de pepino. La presencia de especies beneficiosas de la rizosfera como *Bacillus*, *Rhodanobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Nonomuraea* y *Agrobacterium* fue mayor con el tratamiento con L-S60 que en el grupo control (Qin *et al.*, 2017).

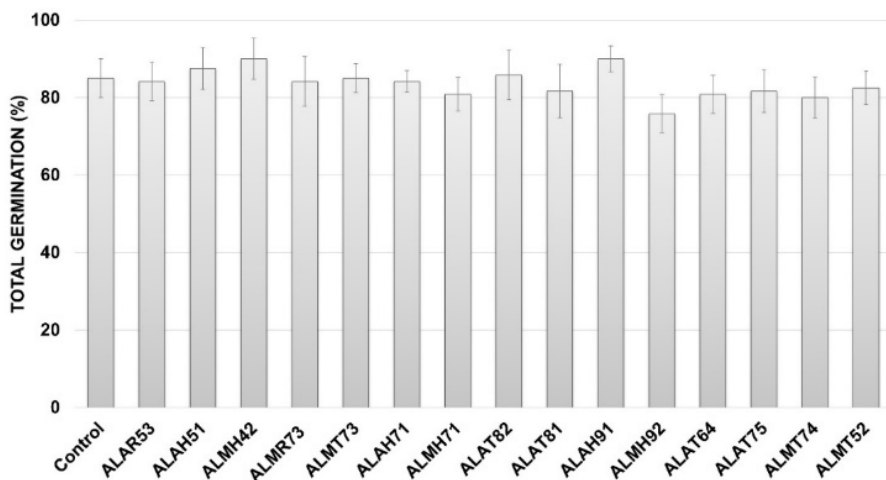
higher upon L-S60 treatment than in the control group (Qin *et al.*, 2017).

Likewise, hypocotyl (figure 3A) and radicle (figure 3B), dry biomass accumulation did not show any statistically significant difference among groups upon inoculation with isolated antagonistic strains. It is important to highlight that seedlings were analyzed at early stages of growth; in future experiments, the impact of these strains on morphometric characteristic of later stages of development will be carried out. Although, there were no statistically significant differences between treatments, a tendency to increase the dry weight can be observed in the hypocotyl with ALAT81 and ALMT74 and in radicle with ALMH71 and ALMT74.

In terms of radicle length, ALAH51, ALMR73, ALMT52, ALAT64, ALMH71, ALMH42, ALAH91 and ALMH92 were statistically equivalent as compared to the control. These observations indicate that the interaction of the mentioned bacteria strains above did not affect radicle growth during early seedling development. However, the rest of the isolated strains tested had negative effects, some of them at higher extend like ALMT73 and ALAT81. On the other hand, hypocotyl length did not show statistically significant difference of any of the treatments as compared to the control (table 4).

Further experimentations will be carried out to find out if these *Bacillus* species strains show antagonistic activities against other important phytopathogens if they have an impact on basil growth and quality in terms





**Figura 2.** Porcentaje de germinación total de plántulas de albahaca tratadas con la bacteria aislada de albahaca que presentó actividad antagonista contra *Aspergillus* spp. después de la incubación durante 5 días a  $25 \pm 1$  °C, 80 % de humedad y en la oscuridad. Los valores presentados son media  $\pm$  desviación estándar. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos  $p > 0,05$ .

**Figure 2.** Total germination percentage of basil seedlings treated with the isolated bacteria from basil that presented antagonistic activity against *Aspergillus* spp. after incubation for 5 days at  $25 \pm 1$  °C, 80 % humidity and in the dark. Values presented are mean  $\pm$  standard deviation. No statistically significant difference among treatments was observed  $p > 0.05$ .

Asimismo, la acumulación de biomasa seca en hipocótilo (figura 3A) y radícula (figura 3B), no mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tras la inoculación con cepas antagonistas aisladas. Es importante resaltar que las plántulas se analizaron en etapas tempranas de crecimiento; en experimentos futuros, se llevará a cabo el impacto de estas cepas en las características morfométricas de

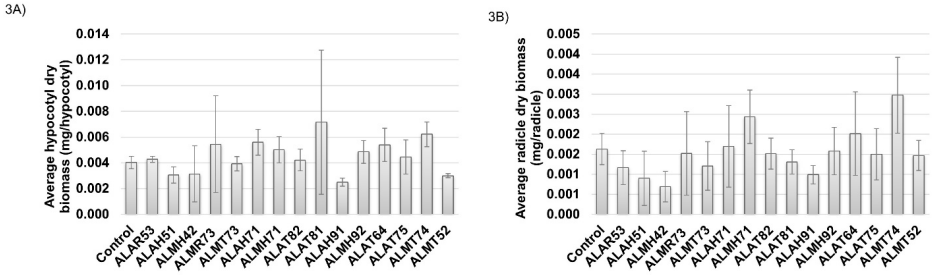
of essential oil and other desirable traits. Moreover, these strains could be used for inoculation of other plants to investigate their biotechnological potential.

## Conclusion

To our knowledge this is the first time that *B. amyloliquefaciens* strains have been isolated from basil

etapas posteriores de desarrollo. Si bien no hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, se puede observar una tendencia a aumentar el peso seco en el hipocótilo con ALAT81 y ALMT74 y en la radícula con ALMH71 y ALMT74.

cultivars. The biotechnological use of these bacteria to protect basil plants against fungi is a sustainable and reliable option to reduce crop loss due to fungi incidence. Furthermore, these bacteria are remarkable allies for basil plant development due to their ability



**Figura 3. Acumulación promedio de biomasa seca de hipocótilo (A) y radícula (B) por plántula de albahaca cultivada después de la inoculación de las semillas con las bacterias aisladas e incubadas durante 5 días a  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 80 % de humedad y en la oscuridad. Los valores presentados son media  $\pm$  desviación estándar. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos  $p > 0,05$ .**

**Figure 3. Average hypocotyl (A) and radicle (B) dry biomass accumulation per basil seedling grown after seeds inoculation with the isolated bacteria and incubated for 5 days at  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 80 % humidity and in the dark. Values presented are mean  $\pm$  standard deviation. No statistically significant difference among treatments was observed  $p > 0.05$ .**

En términos de longitud de radícula, ALAH51, ALMR73, ALMT52, ALAT64, ALMH71, ALMH42, ALAH91 y ALMH92 fueron estadísticamente equivalentes en comparación con el control. Estas observaciones indican que la interacción de las cepas de bacterias

to colonize them without damage. The investigation carried out and presented here in establishes the basis for further studies on agronomic useful these *Bacillus* strains that are naturally occurring in basil plants around La Paz, Baja California Sur, Mexico, where we

mencionadas anteriormente no afectó el crecimiento de la radícula durante el desarrollo temprano de las plántulas. Sin embargo, el resto de las cepas aisladas ensayadas tuvieron efectos negativos, algunos de ellos en mayor extensión como ALMT73 y ALAT81. Por otro lado, la longitud del hipocótilo no mostró una diferencia estadísticamente significativa de ninguno de los tratamientos en comparación con el control (tabla 4).

can find very distinctive environmental conditions like extreme temperatures, high soil salinity and drought.

### Acknowledgments

This work was supported by the Department of Agronomy at the Universidad Autónoma de Baja California Sur. Authors are thankful to Yozitlali Villavicencio-Velázquez

### Cuadro 3. Longitudes de radícula e hipocótilo de plántulas de albahaca de 5 días tratadas con la bacteria aislada que presentó actividad antagonista contra *Aspergillus* spp. incubados a $25 \pm 1$ °C, 80 % de humedad y en la oscuridad.

**Table 3. Radicle and hypocotyl lengths of 5-day old basil seedlings treated with the isolated bacteria that presented antagonistic activity against *Aspergillus* spp. incubated at  $25 \pm 1$  °C, 80 % humidity and in the dark.**

Treatment	Average length (mm)	
	Radicle	Hypocotyl
Control	19.43 <sup>a</sup> ± 8.68	13.25 <sup>abcde</sup> ± 4.26
ALAR53	15.10 <sup>cde</sup> ± 7.71	12.08 <sup>cde</sup> ± 5.14
ALAH51	19.17 <sup>ab</sup> ± 8.48	11.61 <sup>de</sup> ± 4.01
ALMH42	16.50 <sup>abcde</sup> ± 8.08	10.92 <sup>e</sup> ± 4.45
ALMR73	18.56 <sup>abc</sup> ± 8.88	13.65 <sup>abcd</sup> ± 5.32
ALMT73	10.99 <sup>f</sup> ± 5.49	12.38 <sup>cde</sup> ± 4.49
ALAH71	13.92 <sup>def</sup> ± 6.31	14.66 <sup>ab</sup> ± 5.09
ALMH71	16.85 <sup>abcde</sup> ± 7.34	14.98 <sup>a</sup> ± 4.44
ALAT82	15.27 <sup>cde</sup> ± 7.22	13.80 <sup>abcd</sup> ± 4.55
ALAT81	10.19 <sup>f</sup> ± 4.48	12.31 <sup>cde</sup> ± 4.28
ALAH91	16.42 <sup>abcde</sup> ± 8.83	13.79 <sup>abcd</sup> ± 5.17
ALMH92	15.58 <sup>abcde</sup> ± 7.22	14.19 <sup>abc</sup> ± 3.94
ALAT64	16.97 <sup>abcde</sup> ± 9.14	12.62 <sup>abcde</sup> ± 3.85
ALAT75	15.35 <sup>bcde</sup> ± 9.29	12.58 <sup>bcde</sup> ± 4.88
ALMT74	13.07 <sup>ef</sup> ± 7.33	12.98 <sup>abcde</sup> ± 6.06
ALMT52	17.10 <sup>abcd</sup> ± 7.59	14.77 <sup>ab</sup> ± 4.90

a, b, c, d, eValores presentados son la media ± desviación estándar. Una letra diferente en la misma columna representa una diferencia estadísticamente significativa  $p \leq 0,05$

a, b, c, d, eValues presented are mean ± standard deviation. Different letter at the same column represents statistically significant difference  $p \leq 0.05$ .

En futuros experimentos se ensayará si estas cepas de especies de *Bacillus* muestran actividades antagónicas contra otros fitopatógenos importantes si tienen un impacto en el crecimiento y la calidad de la albahaca en términos de aceite esencial y otros rasgos deseables. Además, estas cepas podrían usarse para la inoculación de otras plantas para investigar su potencial biotecnológico.

## Conclusión

Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se han aislado cepas de *B. amyloliquefaciens* de cultivares de albahaca. El uso biotecnológico de estas bacterias para proteger las plantas de albahaca contra los hongos es una opción sostenible y confiable para reducir la pérdida de cultivos debido a la incidencia de hongos. Además, estas bacterias son aliadas notables para el desarrollo de las plantas de albahaca debido a su capacidad para colonizarlas sin dañarlas. La investigación realizada y presentada aquí sienta las bases para futuros estudios sobre la utilidad agronómica de estas cepas de *Bacillus* que se encuentran naturalmente en plantas de albahaca alrededor de La Paz, Baja California Sur, México, donde se pueden encontrar condiciones ambientales muy distintivas como temperaturas extremas, altas temperaturas, salinidad del suelo y sequía.

## Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Departamento de Agronomía de

and José Enrique Amador-Sánchez for technical support.

## *End of English Version*

la Universidad Autónoma de Baja California Sur. Los autores agradecen a Yozitlali Villavicencio-Velázquez y José Enrique Amador-Sánchez por el apoyo técnico.

## Literatura citada

- Adamović, D., I. Dalović and N. Mrkovački. 2015. Microbial abundance in rhizosphere of medicinal and aromatic plant species in conventional and organic growing systems. *Ratarstvo i povrtarstvo*, 52: 1-6. <https://cutt.ly/znRmI2O>
- Banchio, E., X. Xie, H. Zhang, and P. W. Paré. 2009. Soil bacteria elevate essential oil accumulation and emissions in sweet basil. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 653-657. <https://cutt.ly/znRmSq2>
- Broda, D.M., P.A. Lawson, R.G. Bell and D.R. Musgrave. 1999. *Clostridium frigidicarnis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 1539-1550. <https://cutt.ly/snRmDTh>
- Chen, X. H., A. Koumoutsis, R. Scholz, and R. Borriss, 2009. More than anticipated - production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *MIRCEN J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 16: 14-24. <https://cutt.ly/4nRmHmY>
- Daungfu, O., S. Youpensuk and S. Lumyong. 2019. Endophytic bacteria isolated from citrus plants for biological control of Citrus Canker in lime plants. *Tropical Life Sciences Research*, 30: 73-88. <https://cutt.ly/nnRmKkq>
- Gilardi, G., S. Demarchi, A. Garibaldi, and M. L. Gullino. 2013. Management of downy mildew of sweet basil

- (*Ocimum basilicum*) caused by *Peronospora belbahrii* by means of resistance inducers, fungicides, biocontrol agents and natural products. *Phytoparasitica*, 41: 59-72. <https://cutt.ly/4nRmL64>
- Goldman, E. and L.H. Green (Ed.) 2009. *Practical Handbook of Microbiology*, Second Edition. 2nd ed. London, pp.3-63. ISBN 978-0-8493-9365-5
- Gowtham, H.G., M. Murali, S. B.Singh, T. R. Lakshmeesha, K.Narasimha Murthy, K. N. Amruthesh and S. R. Niranjana. 2018. Plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* improves plant growth and induces resistance in chilli against anthracnose disease. *BIOL CONTROL.*, 126: 209-217. <https://cutt.ly/QnRmC4n>
- Hernández-Montiel, L.M., T. Rivas-García, M. Romero-Bastidas, C. J. Chiquito-Contreras, F. H. Ruiz-Espinoza and R. G. Chiquito-Contreras. 2018. Potencial antagonico de bacterias y levaduras marinas para el control de hongos fitopatógenos. *Rev. Mexicana cienc. agric.*, 20: 4311-4321. <https://cutt.ly/JnRmBDJ>
- Jacobs, J.L., T. L. Carroll and G. W. Sundin, 2005. The role of pigmentation, ultraviolet radiation tolerance, and leaf colonization strategies in the epiphytic survival of phyllosphere bacteria. *Microb. Ecol.* 49: 104-113. <https://cutt.ly/CnRmN5H>
- Joo, H.J., H.Y. Kim, L.H. Kim, S.Lee, J.G. Ryu, and T.A. Lee, 2015. *Brevibacillus* sp. antagonistic to mycotoxigenic *Fusarium* spp. *BIOL CONTROL.*, 87: 64-70. <https://cutt.ly/enRm2fT>
- Kim, M.J., R. Radhakrishnan, S.M. Kang, Y.H. You, E.J. Jeong, J.G. Kim and I.J. Lee, 2017. Plant growth promoting effect of *Bacillus amyloliquefaciens* H-2-5 on crop plants and influence on physiological changes in soybean under soil salinity. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23: 571-580. <https://cutt.ly/TnRm9LI>
- Liu, Z., A. Budiharjo, P. Wang, H. Shi, J. Fang, R. Borriss, K. Zhang, and X. Huang, 2013. The highly modified microcin peptide plantazolicin is associated with nematocidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 10081-10090. <https://cutt.ly/bnRm8th>
- Lugtenberg, B. and F. Kamilova. 2005. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 63, 541-556. <https://cutt.ly/jnRm40B>
- Moffat, A.S. 2001. Finding new ways to fight plant diseases. *Science*, 292: 2270-2273. <https://cutt.ly/nnRm6p0>
- Pieterse, C. M. J., C. Zamioudis, R. L. Berendsen, D. M. Weller, S. C. M. Van Wees and P. A. H. M. Bakker. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol*, 52: 347-375. <https://cutt.ly/DnRQqHm>
- Pound, M., A. French, J. Atkinson, D. Wells, M. Bennett and T. Pridmore, 2013. RootNav: Navigating Images of Complex Root Architectures. *Plant Physiology*, 162: 1802-1814. <https://cutt.ly/snRQeXx>
- Purahong, W., L. Orrù, I. Donati, G. Perpetuini, A. Cellini, A. Lamontanara, V. Michelotti, G. Tacconi, and F. Spinelli. 2018. Plant microbiome and its link to plant health: host species, organs, and *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* infection shaping bacterial phyllosphere communities of kiwifruit plants. *Front Plant Sci*, 9: 1563. <https://cutt.ly/EnRQpyM>
- Qin, Y., Q. Shang, Y. Zhang, P. Li and Y. Chai, 2017. *Bacillus amyloliquefaciens* L-S60 reforms the rhizosphere bacterial community and improves growth conditions in cucumber plug seedling. *Front Microbiol*, 8: 2620. <https://cutt.ly/CnRQfcV>
- Raaijmakers, J. M., I. De Bruijn, O. Nybroe and M. Ongena. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 1037-1062. <https://cutt.ly/qnRQhPj>
- Rabbee, M. F., M. S. Ali, J. Choi, B. S. Hwang, S. C. Jeong and Baek K. 2019. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within






- plant microbiomes. *Molecules*, 24: 1046. <https://cutt.ly/5nRQjB6>
- Rios-Velasco, C., J. N. Caro-Cisneros, D. I. Berlanga-Reyes, M. F. Ruíz-Cisneros, J. J. Ornelas-Paz, M. A. Salas-Marina, E. Villalobos-Pérez and V. M. Guerrero-Prieto, 2016. Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 34: 84-99. <https://cutt.ly/InRQHUE>
- Statistical Analysis System (SAS) Software, University Edition; Retrieved May 2, 2020, from. <https://cutt.ly/tnRQLDq>
- Smith, D. L., Praslickova, D., & Ilangumaran, G. 2015. Inter-organismal signaling and management of the phytomicrobiome. *Front Plant Sci*, 6: 722. <https://cutt.ly/CnRQCVT>

## Macrofauna edáfica y propiedades físico-químicas del suelo, en fincas cafetaleras de pequeños agricultores

Edaphic macrofauna and soil physicochemical properties, in smallholder coffee farms

Macrofauna edáfica e propiedades físico-químicas do solo, em fazendas de café de pequenos produtores

Eli Morales Rojas<sup>1\*</sup>, Segundo Chavez Quintana<sup>1</sup>,  
Elder Chichipe Vela<sup>1</sup>, Manuel Oliva<sup>1</sup> y Lenin Quiñones  
Huatangari<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Investigador del instituto de investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES), Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, calle Higos Urco N° 342-350-356 – Calle Universitaria N° 304. Correo electrónico: (EM): [eli.morales@untrm.edu.pe](mailto:eli.morales@untrm.edu.pe), ; (SCh): [segundo.quintana@untrm.edu.pe](mailto:segundo.quintana@untrm.edu.pe),  (ECh) [elder3191@gmail.com](mailto:elder3191@gmail.com), ; (MO): [manuel.oliva@untrm.edu.pe](mailto:manuel.oliva@untrm.edu.pe), . <sup>2</sup>Investigador del instituto de Ciencia de Datos, Universidad Nacional de Jaén, Jaén 06801, Perú. Correo electrónico: [lenin.quinones@unj.edu.pe](mailto:lenin.quinones@unj.edu.pe), .

### Resumen

La macrofauna edáfica es un indicador biológico de suelos poco aplicado en la identificación de su calidad en fincas de café. El objetivo fue evaluar la macrofauna edáfica y las propiedades físico-químicas del suelo en cuatro fincas cafetaleras en diferentes altitudes. Las fincas se seleccionaron en cuatro caseríos de caficultores a pequeña escala. En plantaciones de una hectárea, se muestrearon tres monolitos de 25 × 25 cm de ancho por 30 cm de profundidad. Se tomaron muestras de suelo en cada parcela, luego se determinó el contenido de materia orgánica (MO), potencial de hidrógeno (pH), conductividad eléctrica (CE) y contenido de nitrógeno (N). No hubo diferencias en la diversidad de macrofauna para las altitudes estudiadas, pero sí según época del año (lluvia y estiaje). El índice de Shannon máximo fue de 2,2 (época de lluvia) y de 1,1 (época de estiaje). Los parámetros fisicoquímicos como el pH del suelo osciló entre 7,8 a 8,15 en las fincas de menor altitud y para las fincas de mayor altitud estuvo entre 6,38 y 6,65. El pH estuvo altamente

Recibido: 02-02-2021 . Aceptado: 02-06-2021.

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [eli.morales@untrm.edu.pe](mailto:eli.morales@untrm.edu.pe)

correlacionado de manera negativa con la altitud. Mientras que el nitrógeno estuvo correlacionado de manera positiva con la materia orgánica. La diversidad faunística está correlacionada de manera negativa con las épocas y la presencia de microorganismos está influenciada por las características fisicoquímicas del suelo.

**Palabras clave:** *Coffea arabica*, materia orgánica, hormigas, *Lumbricus* spp., diversidad

### Abstract

Edaphic macrofauna is a biological soil indicator that is rarely applied in the identification of soil quality in coffee farms. The objective was to evaluate edaphic macrofauna and soil physico-chemical properties in four coffee farms at different altitudes. The farms were selected in four hamlets of small-scale coffee farmers. In one-hectare plantations, three monoliths of 25 × 25 cm wide by 30 cm depth were sampled. Soil samples were taken from each plot, then the organic matter (OM) content, hydrogen potential (pH), electrical conductivity (EC) and nitrogen (N) content were determined. There were no differences in macrofaunal diversity for the altitudes studied, but there were differences according to the time of year (rainfall and low water). The maximum Shannon index was 2.2 (rainy season) and 1.1 (dry season). Physico-chemical parameters such as soil pH ranged from 7.8 - 8.15 in the lower altitude farms and for the higher altitude farms it was 6.38 - 6.65. Soil pH was highly negatively correlated with altitude. Nitrogen was positively correlated with organic matter. Faunal diversity is negatively correlated with season and the presence of microorganisms is influenced by the physico-chemical characteristics of the soil.

**Keywords:** *Coffea arabica*, organic matter, ants, *Lumbricus* spp., diversity

### Resumo

A macrofauna edáfica é um indicador biológico da qualidade do solo nas fazendas de café que tem sido pouco aplicado. O objectivo era avaliar a macrofauna edáfica e as propriedades físico-químicas do solo em quatro explorações de café em diferentes altitudes. As fazendas foram seleccionadas em quatro aldeias de pequenos cafeicultores. Em plantações de um hectare, três monólitos de 25 × 25 cm de largura por 30 cm de profundidade foram amostrados. Amostras de solo foram retiradas de cada parcela, depois foi determinados o teor de matéria orgânica (OM), potencial de hidrogénio (pH), condutividade eléctrica (CE) e teor de azoto (N). Não houve diferenças na diversidade macrofaunística para as altitudes estudadas, mas houve diferenças de acordo com a época do ano (estação chuvosa e seca). O índice máximo de Shannon era 2,2 (estação chuvosa) e 1,1 (estação seca). Os parâmetros físico-químicos como o pH do solo variavam entre 7,8 - 8,15 nas explorações de menor altitude e para as explorações de maior altitude era



de 6,38 - 6,65. O pH do solo estava altamente correlacionado negativamente com a altitude. Enquanto que o azoto estava positivamente correlacionado com a matéria orgânica. A diversidade faunística está negativamente correlacionada com as estações do ano e a presença de microorganismos é influenciada pelas características físico-químicas do solo.

**Palavras-chave:** *Coffea arabica*, matéria orgânica, formigas, *Lumbricus* spp., diversidade

## Introducción

La macrofauna del suelo representa la biodiversidad de los ecosistemas influyendo en la naturaleza y el funcionamiento de los suelos (Ferrerías *et al.*, 2009). Diversos organismos son responsables de la creación de macroporos y la redistribución de la materia orgánica en el suelo (Li *et al.*, 2019). Así como las interacciones de los grupos funcionales están determinadas de acuerdo con el uso de tierra y las propiedades físicas y químicas del suelo en diferentes ecosistemas (Calderón-Medina *et al.*, 2018).

Los grupos de macrofauna edáfica son sensibles a las perturbaciones naturales y antrópicas, las cuales puede generar disminución de la estabilidad y la fertilidad del suelo (Pinzón-Triana *et al.*, 2015).

La macrofauna del suelo puede servir como indicador de fertilidad, por existir una fuerte relación entre los indicadores de macrofauna y las características físicas y químicas del suelo (Siregar *et al.*, 2019; Velasquez and Lavelle, 2019) Los componentes de la macrofauna también son conocidos como indicadores biogeográficos, por su gran aptitud en sus ciclos de vida cortos, baja dispersión, al ser indicadores de contaminantes y en que pueden ser afectados por el uso de agroquímicos

## Introduction

The macrofauna of the soil represents the biodiversity of the ecosystems influencing the nature and functioning of the soils (Ferrerías *et al.*, 2009). Various organisms are responsible for the creation of macropores and the redistribution of organic matter in the soil (Li *et al.*, 2019). As well as the interactions of the functional groups are determined according to the land use and the physical and chemical properties of the soil in different ecosystems (Calderón-Medina *et al.*, 2018).

Edaphic macrofauna groups are sensitive to natural and anthropic disturbances, which can cause a decrease in soil stability and fertility (Pinzón-Triana *et al.*, 2015).

The macrofauna of the soil can serve as a fertility indicator, since there is a strong relationship between the macrofauna indicators and the physical and chemical characteristics of the soil (Siregar *et al.*, 2019; Velasquez and Lavelle, 2019). The components of the macrofauna are also known as biogeographic indicators, due to their great aptitude in their short life cycles, low dispersion, as they are indicators of pollutants and in that they can be affected by the use of agrochemicals on farms (Noguera-Talavera, 2011; Sofo *et al.*, 2020).

en las fincas (Noguera-Talavera, 2011; Sofo *et al.*, 2020).

La hojarasca es la principal entrada de nutrientes y energía para los organismos del suelo, y la sombra y la aplicación de abonos orgánicos en el café protegen a los microorganismos de altas temperaturas (Velmourougane, 2016). En el verano, suele evidenciarse la presencia de termitas, las cuales se alimentan de estructuras maderables, su alimentación se basa en lignina y celulosa, por lo tanto, cumplen el rol de organismos descomponedores, generalmente en suelos secos (Calderon y Constantino, 2007; De Souza *et al.*, 2016). Los organismos del suelo expresan en su población y biomasa respuestas ambientales asociadas más con la estructura del agroecosistema que con la variación química (Jiang *et al.*, 2015)

El uso de monolitos en estudios sobre cafetos, en los que se utilice la macrofauna como indicador de la calidad del suelo puede ser la mejor opción para identificar el estado de salud de los distintos tipos de suelo (Baretta *et al.*, 2007; Bignell, 2009).

El tipo de asociación en el sistema de cultivo, así como el gradiente altitudinal influye en la composición de las comunidades edáficas (Rojas-Múnera *et al.*, 2021) Poco se conoce de la variación de la macrofauna edáfica a diferentes altitudes, que sirva como indicador biológico.

Con base en lo mencionado, el objetivo de esta investigación fue evaluar la macrofauna edáfica y las propiedades físico-químicas del suelo en fincas de café, cultivado por pequeños agricultores a diferentes

Leaf litter is the main nutrient and energy input for soil organisms, while shade and organic application of fertilizers in coffee protect microorganisms from high temperatures (Velmourougane, 2016). In the summer, the presence of termites is usually evident, which feed on timber structures, their diet is based on lignin and cellulose, therefore, they play the role of decomposing organisms, generally in dry soils (Calderon and Constantino, 2007; De Souza *et al.*, 2016). Soil organisms express environmental responses in their population and biomass associated more with the structure of the agroecosystem than with chemical variation (Jiang *et al.*, 2015).

The use of monoliths in studies on coffee trees, in which the macrofauna is used as an indicator of soil quality may be the best option to identify the health status of the different types of soil (Baretta *et al.*, 2007; Bignell, 2009).

The type of association in the cropping system, as well as the altitudinal gradient influences the composition of the edaphic communities (Rojas-Múnera *et al.*, 2021). Little is known about the variation of the edaphic macrofauna at different altitudes, which serves as a biological indicator.

Based on the aforementioned, the objective of this research was to evaluate the edaphic macrofauna and the physical-chemical properties of the soil in coffee farms, cultivated by small farmers at different altitudes of the Cajaruro district, Amazonas, Peru.

altitudes del distrito de Cajaruro, Amazonas, Perú.

**Materials and methods**

**Materiales y métodos**

**Ubicación.** La investigación se realizó en el distrito de Cajaruro, ubicado en la margen derecha del río Utcubamba, región Amazonas-Perú. Cuenta con un territorio de 1.763.230 km<sup>2</sup> entre 400 a 2.600 msnm. Los suelos que predominan son los vertisoles (FAO, 2016). El tipo de clima es cálido, varía según los pisos altitudinales de la zona de 10 a 40 °C, la precipitación es de 200 a 7.000 m<sup>3</sup> anuales, los meses de enero a marzo suele llover con mayor intensidad y de junio a septiembre es la época de estiaje (Ancca *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2010).

**Selección de localidades.** Se seleccionaron cuatro fincas cafetaleras de los caseríos de Nuevo Belén (NB) a 985 msnm, San Isidro (SI) a 990 msnm, San Isidro Alto (SIA) a 1186 msnm y Santa Rosa (SR) a 1720 msnm (figura 1). Las coordenadas se tomaron con GPS modelo GPSMAP 66i-GARMIN (cuadro 1).

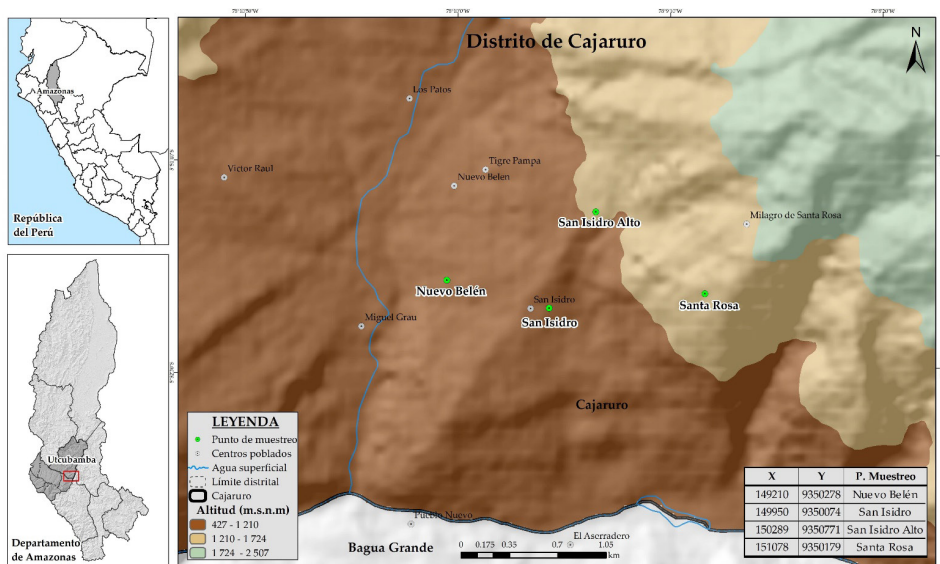
**Location.** The research was carried out in the Cajaruro district, located on the right bank of the Utcubamba River, Amazonas-Peru region. It has a territory of 1,763,230 km<sup>2</sup> between 400 to 2,600 meters above sea level. The soils that predominate are vertisols (FAO, 2016). The type of climate is warm, it varies according to the altitude levels of the area from 10 to 40 °C, the precipitation is from 200 to 7,000 m<sup>3</sup> per year, the months of January to March it usually rains with greater intensity and dry season from June to September (Ancca *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2010).

**Selection of locations.** Four coffee farms were selected from the hamlets of Nuevo Belén (NB) at 985 meters above sea level, San Isidro (SI) at 990 meters above sea level, San Isidro Alto (SIA) at 1186 meters above sea level and Santa Rosa (SR) at 1720 meters above sea level (Figure 1). The coordinates were taken with GPS model GPSMAP 66i-GARMIN (Table 1).

**Cuadro 1. Coordenadas de las fincas de café a diferentes altitudes. Distrito de Cajaruro, margen derecha del Río Utcubamba, región Amazonas-Perú.**

**Cuadro 1. Coordenadas de las fincas de café a diferentes altitudes. Distrito de Cajaruro, margen derecha del Río Utcubamba, región Amazonas-Perú.**

Este	Oeste	Altitud (msnm)	Punto de muestreo
149210	9350278	985	Nuevo Belén (NB)
149950	9350074	990	San Isidro (SI)
150289	9350771	1186	San Isidro Alto (SIA)
151078	9350179	1720	Santa Rosa (SR)



**Figura 1.** Mapa de ubicación de las cuatro fincas de café muestreadas en el distrito de Cajaruro, margen derecha del río Utcubamba, región Amazonas-Perú.

**Figure 1.** Location map of the four coffee farms sampled in the Cajaruro district, right bank of the Utcubamba River, Amazon-Peru region.

**Muestreo.** El muestreo se realizó durante el mes de febrero (época lluviosa) y octubre (época de estiaje) de 2020. Las fincas de café en los caseríos de Nuevo Belén y San Isidro estuvieron asociadas a sombra de *Inga edulis* y *Musa AAB*. Mientras que la finca de San Isidro Alto estuvo asociada a sombra de árboles forestales maderables (*Cedrela odorata*) y la Finca de Santa Rosa estuvo asociada a sombra de *I. edulis*. En cada localidad se seleccionó una finca representativa para muestrear tres monolitos de 25 cm x 25 cm de ancho por 30 cm de profundidad, los monolitos se muestrearon de manera completa,

**Sampling.** The sampling was carried out during the months of February (rainy season) and October (dry season) of 2020. The coffee farms in the hamlets of Nuevo Belén and San Isidro were associated in the shade of *Inga edulis* and *Musa AAB*. While the San Isidro Alto farm was associated with the shade of timber forest trees (*Cedrela odorata*) and the Santa Rosa farm was associated with the shade of *I. edulis*. In each locality, a representative farm was selected to sample three monoliths of 25 cm x 25 cm wide by 30 cm deep, the monoliths were sampled completely, and the methodology described by Ingram

y se aplicó la metodología descrita por Ingram (2018). La limpieza y separación de la macrofauna edáfica se realizó *in situ*, de forma manual con la ayuda de una manta blanca. Consistió en eliminar cuerpos extraños, tales como piedras y residuos vegetales. Los organismos extraídos se almacenaron en frascos con alcohol al 70 % para su posterior traslado, identificación y conteo de manera visual, basado en el manual práctico de macrofauna edáfica de Grisel y Cabrera-Dávila (2014). La identificación y almacenamiento de los individuos se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (UNTRM) de Perú. También se calculó la diversidad con el índice de Shannon (H') (Martínez-aguilar *et al.*, 2020). En cada finca de estudio se recolectaron muestras de suelo, para analizar los parámetros de pH, conductividad eléctrica (CE), con el método EPA 9045/Relación Suelo – Agua 1:1 (Estrada-Herrera *et al.*, 2017). El contenido de carbono orgánico (C) del suelo se estimó a partir de la materia orgánica del suelo (MO), a través del método propuesto por Walkley y Black (1934). Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Investigación de Suelos y Aguas, Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES). La toma de temperatura atmosférica se realizó con un Termohigrómetro Modelo: VA-EDT-1-55 y la temperatura del suelo se tomó con un termómetro digital de aguja de 13 cm, con código 111TMP14.

Para el análisis estadístico se correlacionaron las variables físico-

(2018) was applied. The cleaning and separation of the edaphic macrofauna was carried out *in situ*, manually with the help of a white blanket. It consisted of removing foreign bodies, such as stones and plant residues. The extracted organisms were stored in bottles with 70 % alcohol for their subsequent transfer, identification and counting visually, based on the practical manual of edaphic macrofauna by Grisel and Cabrera-Dávila (2014). The identification and storage of the individuals was carried out in the Laboratorio de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (UNTRM) of Peru. Diversity was also calculated with the Shannon index (H') (Martínez-aguilar *et al.*, 2020). In each study farm, soil samples were collected to analyze the parameters of pH, electrical conductivity (EC), with the EPA 9045/Soil-Water Ratio 1:1 method (Estrada-Herrera *et al.*, 2017). The organic carbon (C) content of the soil was estimated from the soil organic matter (OM), through the method proposed by Walkley and Black (1934). The analyzes were carried out in the Laboratorio de Investigación de Suelos y Aguas, Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES). The atmospheric temperature was taken with a Thermohyrometer Model: VA-EDT-1-55 and the soil temperature was taken with a 13 cm digital needle thermometer, code 111TMP14.

For the statistical analysis, the physical-chemical variables, diversity and altitude were correlated, through

químicas, diversidad y altitud, a través de una prueba de Pearson, a una significancia de  $p \leq 0,05$  y para la tendencia de la temperatura en ambas épocas se realizó con base en sus promedios. Se utilizó el software Minitab 17 (Reyes y Maturel, 2015). Se empleó la prueba t-student para muestras pareadas con la finalidad de comparar la diversidad de macrofauna en las dos épocas de muestreo.

## Resultados y discusión

**Macrofauna edáfica.** Para la época de lluvia en la finca San Isidro Alto se identificó mayor cantidad de familias, con diversidad total de 159 individuos, entre ellos, las lombrices de tierra con 36 individuos y 36 individuos de hormigas. Estos valores pudieron estar relacionados con la humedad del suelo, producto de las constantes lluvias (Welemariam *et al.*, 2018; Santorufo *et al.*, 2012). Asimismo, en la finca Nuevo Belén, situada a menor altitud, se identificaron 137 individuos, con 42 lombrices de tierra, seguido de la finca de Santa Rosa. La finca San Isidro, fue la que mostró menor cantidad de familias, con 23 individuos de hormigas (cuadro 2). La lombriz de tierra es uno de los grupos más importantes de macrofauna del suelo (*Oligochaeta*), ya que aceleran el crecimiento de las plantas (dos Santos *et al.*, 2018)

La biodiversidad máxima fue de 2,18 en la finca de San Isidro Alto, lo cual pudo deberse al tipo de asociación de sombra y a la altitud media a comparación con las demás fincas. Estos resultados tienen relación con

a Pearson test, at a significance of  $p \leq 0.05$  and for the temperature trend in both seasons it was performed based on their averages. Minitab 17 software was used (Reyes and Maturel, 2015). The t-student test was used for paired samples in order to compare the diversity of macrofauna in the two sampling times.

## Results and discussion

**Edaphic macrofauna.** For the rainy season in the San Isidro Alto farm, a greater number of families were identified, with a total diversity of 159 individuals, including earthworms with 36 individuals and 36 individuals of ants. These values could be related to soil moisture, product of constant rains (Welemariam *et al.*, 2018; Santorufo *et al.*, 2012). Likewise, in the Nuevo Belén farm, located at a lower altitude, 137 individuals were identified, with 42 earthworms, followed by the Santa Rosa farm. The San Isidro farm was the one that showed the least number of families, with 23 individuals of ants (table 2). The earthworm is one of the most important groups of soil macrofauna (*Oligochaeta*), since they accelerate plant growth (dos Santos *et al.*, 2018).

The maximum biodiversity was 2.18 in the San Isidro Alto farm, which could be due to the type of shade association and the average altitude compared to the other farms. These results are related to biological sustainability in soils (Lammel *et al.*, 2015). Similarly, Vera-Aviles *et al.* (2020), state that the diversity

**Cuadro 2. Individuos de macrofauna edáfica en un área de 0.625 m<sup>2</sup>, en las cuatro fincas de café, distrito de Cajaruro, margen derecha del Río Utcubamba, región Amazonas-Perú.**

**Table 2. Individuals of edaphic macrofauna in an area of 0.625 m<sup>2</sup>, in the four coffee farms, Cajaruro district, right bank of the Utcubamba River, Amazon-Peru region.**

Grupo Funcional	Orden/Familia/Nombre común	FINCAS MUESTREADAS (0,625 m <sup>2</sup> )							
		Nuevo Belen		San Isidro		San Isidro Alto		Santa Rosa	
		E. Lluvia	E. Estiaje	E. Lluvia	E. Estiaje	E. Lluvia	E. Estiaje	E. Lluvia	E. Estiaje
Detritívoros de la hojarasca	Coleópteros/Scarabaeidae/Shansos	5	1	3	0	9	2	1	1
	Coleópteros/Elateridae/Gusano Blanco	0	0	0	1	0	0	0	0
	Blattodea/Termitidae/Cochesitos	18	4	0	13	17	0	0	1
	Isopoda/Armadillidae/huevito	1	0	1	0	3	0	3	0
	Polydesmida/Paradoxosomatidae/Mil pies	2	0	6	0	5	4	0	3
Ingenieros del suelo	Haplotaxida/Lumbricidae/Lombriz de tierra	42	16	5	1	32	12	44	5
	Lepidoptera/Noctuidae/Oruga	0	0	0	1	0	0	0	1
	Isoptera/Termitidae/Comejen	0	0	0	16	0	0	0	0
	Hymenoptera/Formicidae/Hormiga	19	178	23	191	36	0	17	33
Depredadores	Coleópteros/ Tenebrionidae/Escarabajo Negro	0	0	0	0	4	0	0	0
	Araneae/Lycosidae/Araña	0	0	0	11	0	0	0	3
	Coleópteros/Tenebrionidae/Mosco	0	0	0	4	0	0	0	4
	Scorpiones/Typhlochactidae/Alacran	0	0	0	1	0	0	0	0
	Hymenoptera/Vespididae/Avispa negra	2	0	0	0	4	0	4	1
	Escolopendromorfos/Scolopocryptopidae/Ciempie	3	0	2	10	3	0	1	6
Detritívoros	Pulmonata/Helicidae/Caracol blanco	0	0	0	1	1	0	0	1
Herbívoros	Ortópteros/Grylloidea/Grillo	3	0	1	0	8	0	0	1
	Hemipteros/Pseudococcidae/Ácaro	0	0	0	6	0	0	0	0
	Siphonaptera/Pulicidae/Pulgon	13	0	0	0	4	0	11	0
	Hemiptera/Cydnidae/Chinche	25	2	0	10	30	2	5	1
	Hemiptera/Pseudococcidae/Chinche blanco	4	0	0	0	1	0	0	0
	Hemiptera/Chicharra blanca	0	0	0	0	2	0	2	1
Omnívoros	Blattodea/Blattididae/Cucaracha	0	0	0	6	0	0	0	1
	diversidad l (H')	137 (1,68)	201 (0,5)	41 (1)	272 (0,7)	159 (2,2)	20 (1,1)	88 (1,5)	63 (0,6)
	Máximos	42	178	23	191	36	12	44	33
	Diferencia estadística	0.702		0.179		0.009**		0.633	

No hay diferencias estadísticas significativas entre épocas (p>0,05); Índice de Shannon (H').  
 \*\* Diferencia estadística altamente significativa.

There are no statistically significant differences between seasons (p> 0.05); Shannon index (H').  
 \*\*Highly significant statistical difference.

la sostenibilidad biológica en los suelos (Lammel *et al.*, 2015). Del mismo modo Vera-Aviles *et al.* (2020) afirman que la diversidad de individuos es mayor en agroecosistemas mixtos y está asociada con la calidad de los suelos.

El menor índice de biodiversidad se dio en la finca de San Isidro (1,01), además de una menor cantidad de lombrices de tierra. La diferencia de la diversidad se atribuye a que, en la época de lluvias se evidencia menor temperatura del suelo, la altitud en la que se ubica la finca y el tipo de sombra empleado en las plantaciones de café (Kamau *et al.*, 2017; Karungi *et al.*, 2018).

Durante la época de estiaje, la finca San Isidro Alto se caracterizó por tener menor cantidad de individuos (20), en su mayoría lombrices de tierra y mil pies. Esto pudo suceder por la asociación de árboles forestales de *C. odorata* y al registro de menor temperatura del suelo y de la atmósfera. En ese sentido, la sombra y la hojarasca pudieron ayudar a hospedar individuos de lombrices, lo que podría beneficiar la descomposición de la materia orgánica (Karungi *et al.*, 2018). Algunos autores mencionan que la disminución de la macrofauna puede darse por las condiciones del suelo y al incremento de las temperaturas (Teixeira, 2014). La variación de la diversidad de individuos está en función a las especies arbóreas (Mueller *et al.*, 2016) Nematoda, Oribatida, Gamasida, Opilionida, Araneida, Collembola, Formicidae, Carabidae, La abundancia de hormigas se dio en las fincas de menor altitud, lo cual coincide con el estudio realizado por Silva *et al.* (2015) V Congreso Latinoamericano de Agroecología - (Silva *et al.*, 2015).

of individuals is greater in mixed agroecosystems and is associated with soil quality.

The lowest biodiversity index occurred in the San Isidro farm (1.01), in addition to a lower amount of earthworms. The difference in diversity is attributed to the fact that, in the rainy season, lower soil temperature is evidenced, the altitude at which the farm is located and the type of shade used in coffee plantations (Kamau *et al.*, 2017; Karungi *et al.*, 2018).

During the dry season, the San Isidro Alto farm was characterized by having fewer individuals (20), mostly earthworms and a thousand feet. This could happen due to the association of *C. odorata* forest trees and the lower temperature of the soil and the atmosphere. In this sense, the shade and the litter could help to host individuals of worms, which could benefit the decomposition of organic matter (Karungi *et al.*, 2018). Some authors mention that the decrease in the macrofauna can occur due to soil conditions and increased temperatures (Teixeira, 2014). The variation in the diversity of individuals is a function of the tree species (Mueller *et al.*, 2016). The abundance of ants occurred in the farms of lower altitude, which coincides with the study carried out by Silva *et al.* (2015).

There were no statistical differences ( $p > 0.05$ ) between the farms studied in terms of the diversity of individuals of the edaphic macrofauna. On the other hand, for the San Isidro Alto farm, a highly significant difference ( $p < 0.01$ ) was



No se registraron diferencias estadísticas ( $p > 0,05$ ) entre las fincas estudiadas en cuanto a la diversidad de individuos de la macrofauna edáfica. Por otro lado, para la finca San Isidro Alto, se encontró diferencia altamente significativa ( $p < 0,01$ ) en la diversidad de macrofauna para las dos épocas del año, tal como se observa en el cuadro 2.

**Temperaturas para las dos épocas de muestreo.** En la figura 2, se aprecia la variación de la temperatura promedio del suelo y la temperatura atmosférica para la época de lluvia, la temperatura mínima fue 23 °C y la máxima fue de 28,8 °C; para la época de estiaje la mínima fue de 20,5 °C en la finca de San Isidro Alto, y la temperatura máxima fue de 33°C en la finca de Nuevo Belén. También se puede notar que la temperatura está en función a la altitud.

found in the diversity of macrofauna for the two seasons of the year, as shown in Table 2.

Temperatures for the two sampling times. Figure 2 shows the variation of the average soil temperature and atmospheric temperature for the rainy season, the minimum temperature was 23 °C and the maximum was 28.8 °C; for the dry season, the minimum was 20.5 °C at the San Isidro Alto farm, and the maximum temperature was 33 °C at the Nuevo Belén farm. It can also be noted that the temperature is a function of the altitude.

**Soil fertility parameters.** Table 3 shows the results of the soil properties in the coffee farms, and in which it is evidenced that for the farms of lower altitude (Nuevo Belén, San Isidro, San Isidro Alto) the pH ranges between 7.80 to 8.15, while

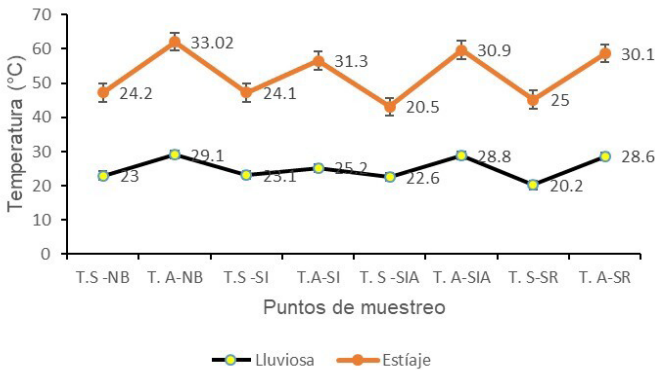


Figura 2. Temperatura promedio del suelo y de la atmosfera.

Figure 2. Average temperature of the soil and the atmosphere.

NB = Finca de Nuevo Belén; SI = Finca de San Isidro; SIA = Finca de San Isidro Alto; SR=Finca de Santa Rosa; T.S =Temperatura del suelo; T.A =Temperatura atmosférica. Distrito de Cajaruro, margen derecha del Río Utcubamba, región Amazonas-Perú.

NB = Farm of Nuevo Belén; SI = Finca de San Isidro; SIA = Farm of San Isidro Alto; SR = Finca de Santa Rosa; T.S = Soil temperature; T.A = Atmospheric temperature. Cajaruro district, right bank of the Utcubamba River, Amazon-Peru region.

**Parámetros de fertilidad de suelo.** En el cuadro 3, se muestran los resultados de las propiedades del suelo en las fincas de café, y en el cual se evidencia que para las fincas de menor altitud (Nuevo Belén, San Isidro, San Isidro Alto) el pH, oscila entre 7,80 a 8,15, mientras que para las fincas de mayor altitud (Santa Rosa) el pH se encuentra en el rango de 6,38 a 6,65. Resultados similares se han reportado en suelos de los Estados Unidos en los que se ha observado una disminución del pH con la altitud (Smith *et al.*, 2002). Así mismo se evidenció que en los suelos de mayor pH, se encontró mayor presencia de hormigas y termitas. Mueller *et al.* (2016) encontró mayor presencia de hormigas en suelos de pH ácido. El nitrógeno más alto fue de 0,28 % y se pudo observar en el suelo de las fincas de San Isidro y San Isidro Alto.

#### **Correlación de variables.**

En el cuadro 4, se observa que la conductividad eléctrica y el nitrógeno están correlacionados de manera positiva con la altitud y el pH está correlacionado de manera negativa. En tal sentido, se afirma que la diversidad está correlacionada de manera negativa con las épocas. La altitud está fuertemente correlacionada de manera negativa con el pH. Sin embargo, el nitrógeno está correlacionado de manera positiva con el contenido de MO. La macrofauna del suelo fue variada en ambas épocas de acuerdo con las altitudes, esto concuerda con lo reportado por Cabrera e Iborra (2018), quienes demostraron que existe correlación entre las propiedades físicas del suelo y

for the higher altitude farms (Santa Rosa) the pH is in the range of 6.38 to 6.65. Similar results have been reported in soils in the United States in which a decrease in pH has been observed with altitude (Smith *et al.*, 2002). Likewise, it was evidenced that in the soils with higher pH, a greater presence of ants and termites was found. Mueller *et al.* (2016), found a higher presence of ants in soils with acidic pH. The highest nitrogen was 0.28 % and could be observed in the soil of the San Isidro and San Isidro Alto farms. **Correlation of variables.** Table 4 shows that electrical conductivity and nitrogen are positively correlated with altitude and pH is negatively correlated. In this sense, it is affirmed that diversity is negatively correlated with season. Altitude is strongly negatively correlated with pH. However, nitrogen is positively correlated with OM content. The soil macrofauna was varied in both seasons according to the altitudes, this agrees with that reported by Cabrera and Iborra (2018), who demonstrated that there is a correlation between the physical properties of the soil and the edaphic macrofauna. In this study it was shown that the highest amount of OM corresponds to the rainy season and at lower altitudes. Organic matter and microbiological activity can be influenced by altitude, temperature, humidity, precipitation and soil characteristics (Sánchez, 2005). When the percentage of nitrogen varies between 0.14 - 0.43 %, coinciding with pH values close to 7, the number of individuals may decrease; however, this may be conditioned by the type of land use (Lwanga *et al.*, 2008).

la macrofauna edáfica. En este estudio se demostró que la mayor cantidad de MO corresponde a la época de lluvias y a altitudes más bajas. La materia orgánica y la actividad microbiológica pueden estar influenciados por la altitud, temperatura, humedad, precipitación y características de los suelos (Sánchez, 2005). Cuando el porcentaje de nitrógeno varía entre 0,14 - 0,43 %, coincidiendo con valores de pH cercanos a 7, el número de individuos puede disminuir; sin embargo, esto puede estar condicionado por el tipo uso del suelo (Lwanga *et al.*, 2008).

**Conclusions**

The seasons of the year (rain or dry season) influence the diversity and abundance of the edaphic macrofauna, with organisms of the *Lumbricidae* family standing out in very humid soils and *Formicidae* in drier and lower altitude soils.

Soil pH is related to altitude and the content of organic matter is directly related to the nitrogen content in the soil.

*End of English Version*

**Cuadro 3. Parámetros físicos y químicos de las cuatro fincas de café pertenecientes a los caseríos de Nuevo Belén, San Isidro Alto y Santa Rosa. Distrito de Cajaruro, margen derecha del Río Utcubamba, región Amazonas-Perú.**

**Table 3. Physical and chemical parameters of the four coffee farms belonging to the hamlets of Nuevo Belén, San Isidro Alto and Santa Rosa. Cajaruro district, right bank of the Utcubamba River, Amazon-Peru region.**

Fincas	pH	CE (dS.m <sup>-1</sup> )	C %	MO %	N %
NB	7,80 <sup>l</sup> ± 0,14	0,65 <sup>l</sup> ± 0,07	2,40 <sup>l</sup> ± 0,71	4,15 <sup>l</sup> ± 1,34	0,25 <sup>l</sup> ± 0,07
	8,00 <sup>e</sup> ± 0,28	0,60 <sup>e</sup> ± 0,14	2,45 <sup>e</sup> ± 0,49	4,05 <sup>e</sup> ± 0,64	0,25 <sup>e</sup> ± 0,07
SI	8,00 <sup>l</sup> ± 0,57	0,20 <sup>l</sup> ± 0,00	3,30 <sup>l</sup> ± 0,28	5,70 <sup>l</sup> ± 0,42	0,28 <sup>l</sup> ± 0,04
	8,30 <sup>e</sup> ± 0,14	0,29 <sup>e</sup> ± 0,01	3,10 <sup>e</sup> ± 0,57	4,10 <sup>e</sup> ± 0,85	0,22 <sup>e</sup> ± 0,02
SIA	7,80 <sup>l</sup> ± 0,57	0,40 <sup>l</sup> ± 0,14	3,20 <sup>l</sup> ± 0,57	5,50 <sup>l</sup> ± 0,85	0,28 <sup>l</sup> ± 0,04
	8,15 <sup>e</sup> ± 0,07	0,40 <sup>e</sup> ± 0,14	2,20 <sup>e</sup> ± 0,42	3,85 <sup>e</sup> ± 0,21	0,25 <sup>e</sup> ± 0,07
SR	6,38 <sup>l</sup> ± 1,10	0,21 <sup>l</sup> ± 0,01	1,97 <sup>l</sup> ± 0,23	3,38 <sup>l</sup> ± 0,45	0,18 <sup>l</sup> ± 0,04
	6,65 <sup>e</sup> ± 0,21	0,14 <sup>e</sup> ± 0,06	2,73 <sup>e</sup> ± 0,75	5,80 <sup>e</sup> ± 0,28	0,24 <sup>e</sup> ± 0,06

<sup>l</sup>Epoca de lluvias; <sup>e</sup> época de estiaje; NB = Finca Nuevo Belén; SI = Finca San Isidro; SIA = Finca San Isidro Alto; SR = Santa Rosa.

<sup>l</sup>Rainy season; <sup>e</sup>dry season; NB = Finca Nuevo Belén; SI = Finca San Isidro; SIA = Finca San Isidro Alto; SR = Santa Rosa.

**Cuadro 4. Correlaciones de las variables fisicoquímicas evaluadas según la época del año, el índice de diversidad y la altitud. Distrito de Cajaruro, margen derecha del Río Utcubamba, región Amazonas-Perú.**

**Table 4. Correlations of the physicochemical variables evaluated according to season of the year, diversity index and altitude. Cajaruro district, right bank of the Utcubamba River, Amazon-Peru region.**

	Época	(H')	No. Indi	Ph	CE	C	MO	N	Altitud
Época	1	-0,800*	0,203	0,209	0,098	-0,106	-0,549	-0,123	0,000
(H')	-0,800*	1	-0,117	-0,098	0,030	-0,009	0,444	0,149	0,033
No. Ind	0,203	-0,117	1	0,362	0,347	0,269	0,060	-0,144	-0,426
pH	0,209	-0,098	0,362	1	0,506	0,429	0,576	0,576	-0,939**
CE	0,098	0,030	0,347	0,506	1	-0,326	0,067	0,197	-0,624
C	-0,106	-0,009	0,269	0,429	-0,326	1	0,655	0,627	-0,408
MO	-0,549	0,444	0,060	0,576	0,067	0,655	1	0,708*	-0,641
N	-0,123	0,149	-0,144	0,576	0,197	0,627	0,708*	1	-0,563
Altitud	0,000	-0,033	-0,426	-0,939**	-0,624	-0,408	-0,641	-0,563	1

\*La correlación es estadísticamente significativa en el nivel 0,05 (bilateral); \*\* La correlación es estadísticamente significativa en el nivel 0,01 (bilateral); No. Indi = Número de individuos; (H') = Índice de Shannon.

\*The correlation is statistically significant at the 0.05 level (bilateral); \*\*The correlation is statistically significant at the 0.01 level (bilateral); No. Indi = Number of individuals; (H') = Shannon index.

## Conclusiones

Las épocas del año (lluvia o estiaje) influyen en la diversidad y abundancia de la macrofauna edáfica, sobresaliendo organismos de la familia *Lumbricidae* en suelos muy húmedos y *Formicidae* en suelos más secos y de menor altitud.

El pH del suelo está relacionado a la altitud y el contenido de materia orgánica tiene relación directa con el contenido de nitrógeno en el suelo.

## Literatura citada

Ancca, J., J. Pinto, S. Vega, A. Cáceres and C. Náquira. 2008. Características

morfométricas, genéticas, alimenticias y vectoriales de *Panstrongylus herreri* procedentes de Jaén (Cajamarca) y Cajaruro Amazonas, Perú. Rev. peru. med. exp. salud pública, 25(1): 17–25. <https://cutt.ly/Qnk6vH9>

Baretta, D., A. D. Brescovit, I. Knysak and E. J. B. N. Cardoso. 2007. Trap and soil monolith sampled edaphic spiders (Arachnida: Araneae) in Araucaria angustifolia forest. Sci. Agríc. (Online), 64(4): 375–383. <https://cutt.ly/onk6mYC>

Bignell, D. E. 2009. Towards a universal sampling protocol for soil biotas in the humid tropics. Pesqui. Agropecu. Bras. (Online), 44(8): 825–834. <https://cutt.ly/tnk6Ej4>

Cabrera Dávila, G. D. L. C., y G. M. L. Iborra. 2018. Ecological characterization of soil macrofauna in two evergreen

- forest sites at el salón, sierra del rosario, Cuba. *Bosque*, 39(3): 363–373. <https://cutt.ly/Bnk6GARG>
- Calderón-Medina, C. L., G. P. Bautista-Mantilla y S. Rojas-González, 2018. Propiedades químicas, físicas y biológicas del suelo, indicadores del estado de diferentes ecosistemas en una terraza alta del departamento del Meta. *Orinoquia*, 22(2): 141–157. <https://cutt.ly/Znk6Fol>
- Calderon, R. A. and R. Constantino. 2007. Systematics , morphology and physiology - A Survey of the Termite Fauna (Isoptera) of an Eucalypt Plantation in Central Brazil. *Neotrop. Entomol.*, 36(3)(June): 391–395. <https://cutt.ly/6nk6Hxf>
- De Souza, S. T., P. C. Cassol, D. Baretta, M. L. C. Bartz, O. Klauberger Filho, Á. L. Mafra, and M. G. Da Rosa. 2016. Abundance and diversity of soil macrofauna in native forest, eucalyptus plantations, perennial pasture, integrated crop-livestock, and no-tillage cropping. *Rev. Bras. Ciênc. Solo (Online)*, 40: 1–14. <https://cutt.ly/Rnk6KYV>
- dos Santos, J. B., A. C. Ramos, R. Azevedo Júnior, L. C. I. de Oliveira Filho, D. Baretta, e E. J. B. N. Cardoso. 2018. Soil macrofauna in organic and conventional coffee plantations in Brazil. *Biota Neotrop.*, 18(2). <https://cutt.ly/lnk6Xtt>
- Estrada-Herrera, I. R., C. Hidalgo-Moreno, R. Guzmán-Plazola, J. J. Almaraz Suárez, H. Navarro-Garza, and J. D. Etchevers-Barra. 2017. Soil quality indicators to evaluate soil fertility. *Agrociencia*, 51(8), 813–831. <https://cutt.ly/Pnk6VTn>
- FAO. (2016). Estado mundial del recurso del suelo (EMRS) - Resumen Técnico. In Fao. <https://cutt.ly/cnk60xH>
- Ferreras, L., S. Toresani, B. Bonel, E. Fernández, S. Bacigaluppo, V. Faggioli y C. Beltrán. 2009. Parámetros químicos y biológicos como indicadores de calidad del suelo en diferentes manejos. *Cienc. suelo (En línea)*, 27(1): 103–114. <https://cutt.ly/Hnk6345>
- Grisel, y Cabrera-Dávila. 2014. Manual práctico como indicador biológico de la calidad del suelo. Fundación Rufford (RSGF, para la Conservación de la Naturaleza). <https://cutt.ly/3nlqhiD>
- Ingram, J. S. I. 2018. Colorimetric determination of nitrogen and phosphorous tropical soil biology and fertility. In: *Tropical Soil Biology and Fertility a Handbooks and Methods (Issue January 1993)*. Second Edition. <https://www.researchgate.net/publication/284229117>
- Jiang, M., X. Wang, Y. Liusui, X. Sun, C. Zhao, and H. Liu. 2015. Diversity and abundance of soil animals as influenced by long-term fertilization in grey desert soil, China. *Sustainability (Switzerland)*, 7(8): 10837–10853. <https://cutt.ly/SnlqnaK>
- Kamau, S., E. Barrios, N. K. Karanja, F. O. Ayuke and J. Lehmann. 2017. Soil macrofauna abundance under dominant tree species increases along a soil degradation gradient. *Soil Biology and Biochemistry*, 112: 35–46. <https://cutt.ly/lnlqQhq>
- Karungi, J., S. Cherukut, A. R. Ijala, J. B. Tumuhairwe, J. Bonabana-Wabbi, E. A. Nuppenau, M. Hoehner, S. Domptail and A. Otte. 2018. Elevation and cropping system as drivers of microclimate and abundance of soil macrofauna in coffee farmlands in mountainous ecologies. *Appl Soil Ecol*, 132(August): 126–134. <https://cutt.ly/4nlqE0B>
- Lammel, D. R., L. C. B. Azevedo, A. M. Paula, R. D. Armas, D. Baretta, and E. J. B. N. Cardoso. 2015. Microbiological and faunal soil attributes of coffee cultivation under different management systems in Brazil. *Braz. J. Biol. (Online)*, 75(4): 894–905. <https://cutt.ly/DnlqYO4>
- Li, F., P. Qiu, B. Shen and Q. Shen 2019. Soil aggregate size modifies the impacts of fertilization on microbial communities. *Geoderma*, 343(January): 205–214. <https://cutt.ly/qlnlQOfa>
- Lwanga, E. H., J. Rodríguez-olán, and I. Evia-castillo, 2008. Relación entre la fertilidad del suelo y su población

de macroinvertebrados. *Terra Latinoamericana*, 26(2): 171–181. <https://cutt.ly/znlqAKR>

Económica de Amazonas. 199. <https://cutt.ly/znlwodN>

- Martínez-aguilar, F. B., F. Guevarahernández, C. E. Aguilar-jiménez, L. A. Rodríguez-larramendi, M. Beatriz, R. Manuel, y A. La, 2020. Caracterización físico-química y biológica del suelo cultivado con maíz en sistemas convencionales, agroecológico y mixto en la Frailesca, Chiapas. *Terra Latinoamericana*, 38: 871–881. <https://cutt.ly/SnlqK7S>
- Mueller, K. E., N. Eisenhauer, P. B. Reich, S. E. Hobbie, O. A. Chadwick, J. Chorover, T. Dobies, C. M. Hale, A. M. Jagodziński, I. Kalucka, M. Kasprowicz, B. Kieliszewska-Rokicka, J. Modrzyński, A. Roz'en, M. Skorupski, L. Sobczyk, M. Stasińska, L. C. Trocha, J. Weiner and J. Oleksyn. 2016. Light, earthworms, and soil resources as predictors of diversity of 10 soil invertebrate groups across monocultures of 14 tree species. *Soil Biology and Biochemistry*, 92(October): 184–198. <https://cutt.ly/QnlqCgD>
- Noguera-Talavera, A. R. S. M. A. 2011. Diversidad y distribución de la macrofauna edáfica en dos sistemas de manejo de *Moringa oleifera* (Lam.): relación con las propiedades del suelo. *La Calera*, 16: 81–85. Doi: 10.5377/calera.v17i29.6528
- Pinzón Triana, S., Rousseau, G., Rocha da Piedad, A., Celentano, D., Corrêa Zelarayán, M. y H. Braun, 2015. La macrofauna del suelo como indicadora de degradación de bosques ribereños en la amazonia oriental brasilera. *Revista de La Facultad de Agronomía, La Plata*, 114(1): 49–60. <https://cutt.ly/anlq9x8>
- Reyes, Y., y L. N. Maturel. 2015. El análisis estadístico aplicado a la gestión de la enseñanza para la toma de decisiones. *Rev. Cuba. cienc. inform. (En línea)*, 9(3): 113127. <https://cutt.ly/Cnlq80y>
- Rodríguez, A. F., H. L. Limachi, F.R. Reátegui, T. R. Escobedo, B. J. Ramírez, C. F. Encarnación, G. J. Maco, C. W. Guzmán, M. W. Castro. 2010. Zonificación Ecológica y Rojas-Múnera, D. M., A. Feijoo-Martínez, L. J. Molina-Rico, M. C. Zúñiga, and H. Quintero. 2021. Differential impact of altitude and a plantain cultivation system on soil macroinvertebrates in the Colombian Coffee Region. *Appl Soil Ecol*, 164(June 2020). <https://cutt.ly/Onlwidi9>
- Sánchez, B. R. M. R. 2005. Materia orgánica y actividad biológica del suelo en relación con la altitud, en la cuenca del río Maracay, estado Aragua. *Agronomía Tropical*, 55(June 2016): 5007–5534. <https://cutt.ly/Anlwgiw>
- Santorufu, L., C. A. M. Van Gestel, A. Rocco and G. Maisto. 2012. Soil invertebrates as bioindicators of urban soil quality. *Environmental Pollution*, 161: 57–63. <https://cutt.ly/EnlwjRj>
- Silva, E. da, E. Velásquez, A. Santos, M. L. C. Bartz, P. Lavelle y G. G. Brown. 2015. Indicador general de calidad del suelo en diferentes sistemas de uso del suelo en el Sur de Brasil. V Congreso Latinoamericano de Agroecología - SOCLA, 1, 6–10. <https://cutt.ly/tnlw3jy>
- Siregar, R., A. Nasution and Z. Marheni. 2019. Exploration of macrofauna in Coffee plants. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 305(1). <https://cutt.ly/SnlwvmV>
- Smith, J. L., J. J. Halvorson, and H. Bolton, 2002. Soil properties and microbial activity across a 500 m elevation gradient in a semi-arid environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(11): 1749–1757. <https://cutt.ly/Enlwnbr>
- Sofu, A., A. N. Mininni and P. Ricciuti, 2020. Soil macrofauna: A key factor for increasing soil fertility and promoting sustainable soil use in fruit orchard agrosystems. *Agronomy*, 10(4): e456 <https://cutt.ly/tnlwQiS>
- Teixeira, V.M. E. S. M. Silva. 2014. Fauna edáfica em sistemas arborizados de café conilon em. *Coffee Science*, 9(3): 385–393. <https://cutt.ly/3nlwEiX>








- Velasquez, E. and P. Lavelle, 2019. Soil macrofauna as an indicator for evaluating soil based ecosystem services in agricultural landscapes. *Acta Oecologica*, 100(July 2018): 103446. <https://cutt.ly/BnlwToS>
- Velmourougane, K. 2016. Impact of organic and conventional systems of coffee farming on soil properties and culturable microbial diversity. *Scientifica*, Article ID 3604026
- Vera-aviles, D., C. Suarez-capello, M. Llugany, C. Poschenrieder, P. De Santis and M. Cabezas-guerrero. 2020. Arthropod diversity influenced by two musa-based agroecosystems in ecuador. *Agriculture (Switzerland)*, 10(6): 1–13. <https://cutt.ly/ynlwId2>
- Welemariam, M., F. Kebede, B. Bedadi and E. Birhane. 2018. The effect of community-based soil and water conservation practices on abundance and diversity of soil macroinvertebrates in the northern highlands of Ethiopia. *Agronomy*, 8(4): 8040056 <https://cutt.ly/7nlwPdQ>
- Walkley, A., and I. A. Black. 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37(1): 29–38. <https://cutt.ly/InlwSx0>

## Characterization of rhizospheric bacteria isolated from soil cultivated with sugarcane in Tamaulipas state, Mexico

Caracterización de bacterias rizosféricas aisladas de suelo cultivado con caña de azúcar en el estado de Tamaulipas, México

Caracterização de bactérias rizosféricas isoladas de solo cultivado com cana-de-açúcar no estado de Tamaulipas, México

Jesús Gerardo García Olivares<sup>1</sup>, Martín Abraham Reyes Lara<sup>2</sup>, Juan flores Gracia<sup>2</sup>, Jesús Di Carlo Quiroz Velásquez<sup>1</sup>, Israel García León<sup>1</sup>, José Reyes Hernández<sup>3</sup> y Homar Rene Gill Langarica<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México C.P. 88710. Correo electrónico: (JG) [jggarcia@ipn.mx](mailto:jggarcia@ipn.mx), ; (JQ) [jquiroz@ipn.mx](mailto:jquiroz@ipn.mx), ; (IG) [igleon00@gmail.com](mailto:igleon00@gmail.com), ; (HG) [hgill@ipn.mx](mailto:hgill@ipn.mx), . <sup>2</sup>Instituto Tecnológico de Cd. Victoria Cd. Victoria, Tamaulipas, México C.P. 87010. Correo electrónico: (MR) [tinorey\\_90@hotmail.com](mailto:tinorey_90@hotmail.com), ; (JG) [jfloresgracia@yahoo.com.mx](mailto:jfloresgracia@yahoo.com.mx), . <sup>3</sup>Universidad Autónoma de Tamaulipas Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Col. Jardín C.P. 89840, México. Correo electrónico: [biologo.reyes@hotmail.com](mailto:biologo.reyes@hotmail.com), .

### Abstract

The state of Tamaulipas, Mexico, has two important sugar mills, with plantations of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) of more than 50 years, the objective of the study was the identification and bacterial characterization in the production of indole-3-acetic acid (IAA), the solubilization of phosphorus and plant growth of bacterial isolates from the rhizosphere of sugarcane. The isolation and morphological characterization were in 30 rhizosphere soil samples of the sugarcane variety CP 72-2086 using the Luria-Bertani media, Congo Red Agar and Potato Dextrose Agar. The molecular characterization was with the 16S rRNA gene

Received el 14-02-2021 • Accepted el 28-05-2021.

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [hgill@ipn.mx](mailto:hgill@ipn.mx); [jggarcia@ipn.mx](mailto:jggarcia@ipn.mx)



and the bacterial inoculation consisted of seedlings of the variety CP 72-2086. 121 strains (38 species) were isolated, being *Bacillus* sp. most frequently, 14 species were positive for phosphorus solubilization: *Bacillus* sp. (6), *Pseudomonas* spp. (5), *Paenibacillus* (2) *Streptomyces venezuelae* (1) stand out. The greater phosphorus solubilization was *Pseudomonas mediterranea* (21.6 mm). Nine bacteria showed production close to 5 ppm IAA: *Bacillus aryabhatai* (6 ppm), *Bacillus pumilus* (5.8 ppm) and *Ensifer adhaerens* (5.6 ppm). *Bacillus megaterium* showed a higher percentage of chlorophyll and foliar nitrogen. In the present analysis, 38 bacterial species associated with the rhizosphere of the sugarcane variety CP 72-2086 were identified, so these results showed the potential to select native bacteria that have the ability to stimulate plant growth of the variety CP 72-2086.

**Key words:** *Saccharum officinarum* L., *Bacillus* spp., indole-3-acetic acid (IAA), phosphorus.

### Resumen

El estado de Tamaulipas, México, cuenta con dos ingenios azucareros importantes, con plantaciones de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) de más de 50 años, el objetivo del estudio fue la identificación y la caracterización bacteriana en la producción de ácido indol-3-acético (IAA), la solubilización de fósforo y crecimiento vegetal de aislados bacterianos de la rizosfera de caña de azúcar. El aislamiento y la caracterización morfológica fue en 30 muestras de suelo de la rizosfera de la variedad de caña de azúcar CP 72-2086 usando los medios Luria-Bertani, agar rojo congo y agar papa dextrosa. La caracterización molecular fue con el gen 16S rRNA y la inoculación bacteriana consistió en plántulas de la variedad CP 72-2086. Se aislaron 121 cepas, *Bacillus* sp. fue la bacteria más frecuente, 14 especies fueron positivas a fósforo, *Bacillus* sp. (6), *Pseudomonas* spp. (5), *Paenibacillus* (2) *Streptomyces venezuelae* (1). La mayor solubilización de fósforo fue para *Pseudomonas mediterranea* (21,6 mm). Nueve bacterias presentaron una producción cercana a 5 ppm de IAA, sobresalen *Bacillus aryabhatai* (6 ppm), *Bacillus pumilus* (5,8 ppm) y *Ensifer adhaerens* (5,6 ppm). *Bacillus megaterium* mostró mayor porcentaje de clorofila y nitrógeno foliar. En el presente análisis se lograron identificar 38 especies bacterianas asociadas a la rizosfera de la variedad de caña de azúcar CP 72-2086, por lo que estos resultados mostraron el potencial para seleccionar bacterias nativas que tienen la capacidad de estimular el crecimiento vegetal de la variedad CP 72-2086.

**Palabras clave:** *Saccharum officinarum* L., *Bacillus* spp., ácido indol-3-acético (IAA), fósforo.

### Resumo

O estado de Tamaulipas, no México, possui duas importantes usinas açucareiras, com plantações de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) de mais de 50 anos,

o objetivo do estudo foi a identificação e caracterização bacteriana na produção de ácido indol- 3- ácido acético (IAA), solubilização de fósforo e crescimento de plantas de isolados bacterianos da rizosfera da cana-de-açúcar. O isolamento e a caracterização morfológica foram realizados em 30 amostras de solo da rizosfera da variedade de cana-de-açúcar CP 72-2086 utilizando os meios Luria-Bertani, ágar vermelho do Congo e ágar batata dextrose. A caracterização molecular foi com o gene 16S rRNA e a inoculação bacteriana consistiu em mudas da variedade CP 72-2086. 121 cepas, *Bacillus* sp. foi a bactéria mais frequente, 14 espécies foram positivas para fósforo, *Bacillus* sp. (6), *Pseudomonas* spp. (5), *Paenibacillus* (2) *Streptomyces venezuelae* (1). A maior solubilização de fósforo foi para *Pseudomonas mediterranea* (21,6 mm). Nove bactérias apresentaram produção próxima a 5 ppm de IAA, destacando-se *Bacillus aryabhatai* (6 ppm), *Bacillus pumilus* (5,8 ppm) e *Ensifer adhaerens* (5,6 ppm). *Bacillus megaterium* apresentou maior porcentagem de clorofila e nitrogênio foliar. Na presente análise, foram identificadas 38 espécies bacterianas associadas à rizosfera da variedade de cana-de-açúcar CP 72-2086, portanto esses resultados mostraram o potencial para selecionar bactérias nativas que têm a capacidade de estimular o crescimento de plantas da variedade CP 72-2086.

**Palabras-chave:** *Saccharum officinarum* L., *Bacillus* spp., ácido indol-3-acético (IAA), fósforo.

## Introduction

The sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivation in Mexico is one activity of major importance in the national economy, it is a crop that allows a wide production diversity, an example in Tamaulipas sugar mills “Aarón Sáenz Garza” and “El Mante” generate a great economic spill (Castro-Nava *et al.*, 2010). The activity derived from sugarcane cultivation in Mexico producing areas is not only affected productively and economically by biotic and abiotic factors also is cultivated under the monoculture system, a practice that has impoverished and degraded soil (Solanki *et al.*, 2017). Conditions that have been aggravated by practices applying high agrochemicals amounts and chemical fertilizers (Torriente,

## Introducción

El cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en México es una actividad de gran importancia en la economía nacional, es un cultivo que permite una amplia diversidad productiva, ejemplo en Tamaulipas los ingenios azucareros “Aarón Sáenz Garza” y “El Mante” generan un gran derrame económico (Castro-Nava *et al.*, 2010). La actividad derivada del cultivo de la caña de azúcar en las zonas productoras de México no solo se ve afectada productiva y económicamente por factores bióticos y abióticos también se cultiva bajo el sistema de monocultivo, práctica que ha empobrecido y degradado los suelos (Solanki *et al.*, 2017). Estas condiciones se han visto agravadas por prácticas que aplican altas cantidades de

2010). Therefore, it is necessary to investigate cultivation technologies are profitable and do not affect environment with more sustainable cultivation practices.

One way to temper bad practices is through soil microflora study, coupled with implementation agricultural practices that stimulate native populations of microorganisms in sugarcane rhizosphere cultivation, growth and health of plants (Momose *et al.*, 2009; Ashraf *et al.*, 2011; Saharan and Nehra, 2011), since we must take advantage of fact soil microorganisms are associated with crops, based on those interact positively with plants (Morgan *et al.*, 2005; Bhattacharyya and Jha, 2012; Quecine *et al.*, 2012), and also from adaptive point view, plants select microorganisms that contribute most its development, for example, bacteria of genus *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* and *Serratia*, among others can colonize plant tissue (Saharan and Nehra, 2011; Criollo *et al.*, 2012), as well as fungi that have been proven to promote plant growth such as those of genus *Trichoderma*, which has been reported that stimulate growth grasses such as sorghum and maize among others plants (Hernández-Mendoza *et al.*, 2018).

Investigations show potential to select *in situ* microorganisms with potential to optimize assimilate nutrients and possess substances stimulate plant growth or act as bioinsecticides or biofungicides,

agroquímicos y fertilizantes químicos (Torriente, 2010). Por lo tanto, es necesario investigar las tecnologías de cultivo que sean rentables y no afecten el medio ambiente con prácticas de cultivo más sostenibles.

Una forma de moderar las malas prácticas es mediante el estudio de la microflora del suelo, junto con la implementación de prácticas agrícolas que estimulen las poblaciones nativas de microorganismos en el cultivo, el crecimiento y la salud de las plantas en la rizosfera de la caña de azúcar (Momose *et al.*, 2009; Ashraf *et al.*, 2011; Saharan y Nehra, 2011), ya que debemos aprovechar el hecho de que los microorganismos del suelo están asociados con los cultivos, en base a que estos interactúan positivamente con las plantas (Morgan *et al.*, 2005; Bhattacharyya y Jha, 2012; Quecine *et al.*, 2012), y también desde el punto de vista adaptativo, las plantas seleccionan los microorganismos que más contribuyen a su desarrollo, por ejemplo, bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Serratia*, entre otros pueden colonizar tejido vegetal (Saharan y Nehra, 2011; Criollo *et al.*, 2012), así como hongos que han demostrado promover el crecimiento de las plantas como los del género *Trichoderma*, que se ha reportado que estimulan el crecimiento de gramíneas como sorgo y maíz entre otras plantas (Hernández-Mendoza *et al.*, 2018).

Las investigaciones muestran potencial para seleccionar microorganismos *in situ* con potencial

because they are native microbiota and have a high degree adaptation. Therefore, to know the bacterial diversity associated with the cultivation of sugarcane and its potential as biofertilizers, is a first step to take advantage of the benefits that lead to the association of the sugarcane plant and rhizobacteria in the productive system of sugar mills “Aarón Sáenz Garza” and “El Mante” in Tamaulipas Mexico, for these reasons, the main objective of the study was to evaluate the production of indole-3-acetic acid, the solubilization of mineral phosphorus and the production of shoots in the greenhouse from bacteria isolated from the rhizosphere of sugarcane cultivated in calcareous soils from the state of Tamaulipas, Mexico.

## Materials and methods

**Location.** For this study, soils of sugarcane mills in the municipalities El Mante (latitude N 22°74'78.30" and length E 98°98'27.99"), Gómez Farías (latitude N 22°42'32" and length E 0°30'43") and Xicoténcatl (latitude N 22°59'00" and length E 98°57'00") from Tamaulipas state, Mexico, were selected. The microbiology study was carried out in soil grow with sugarcane variety CP 72-2086.

**Soil samples collection and samples preparation.** In 30 randomly chosen plots, five soil samples were collected from the rhizosphere of the sugarcane plant. Samples were collected at a depth 30 cm composed of five points in each lot and subsequently homogenized and dried

para optimizar la asimilación de nutrientes y poseer sustancias que estimulen el crecimiento de las plantas o actúen como bioinsecticidas o biofungicidas, debido a que son microbiota nativa y tienen un alto grado de adaptación. Por tanto, conocer la diversidad bacteriana asociada al cultivo de la caña de azúcar y su potencial como biofertilizantes, es el primer paso para aprovechar los beneficios que conllevan la asociación de la planta de caña de azúcar y rizobacterias en el sistema productivo de los ingenios azucareros “Aarón Sáenz Garza” y “El Mante” en Tamaulipas México, por estas razones, el objetivo principal del estudio fue evaluar la producción de ácido indol-3-acético, la solubilización de fósforo mineral y la producción de brotes en invernadero a partir de bacterias aisladas de la rizosfera de caña de azúcar cultivada en suelos calcáreos del estado de Tamaulipas, México.

## Materiales y métodos

**Localización.** Para este estudio, fueron seleccionados suelos de ingenios de caña de azúcar en los municipios El Mante (latitud N 22°74'78.30" y longitud E 98°98'27.99"), Gómez Farías (latitud N 22°42'32" y longitud E 0°30'43") y Xicoténcatl (latitud N 22°59'00" y longitud E 98°57'00") del estado de Tamaulipas, México. El estudio de microbiología se realizó en suelo de cultivo con caña de azúcar variedad CP 72-2086.

**Toma de muestras de suelo y preparación de muestras.** En 30 parcelas elegidas al azar, se

in shade. Bacterial isolation consisted of using 1 g of soil diluted in sterile isotonic saline, 100  $\mu$ L of the dilution in triplicate was placed in sterile Petri dishes with growth medium and incubated at 30 °C for 48 hours. The selection of the colonies was carried out by morphology and the counting of the colonies was done by the method of Swanson *et al.* (2001), three culture media, Luria-Bertani (LB), congo red agar and potato dextrose agar (PDA) were used for bacterial isolation (Berkhoff and Vinal, 1986).

**Molecular identification.** The protocol PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent of Applied Biosystems for DNA was used (Mullis and Faloona, 1987), the protocol allowed to perform a PCR directly. The 16S rRNA gene was amplified using universal primer Sx-(AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) and Ay-(ACCTTGTTACGACTT) (Naveed *et al.*, 2014). Amplification cycle was included an initial denaturation (94 °C, 5 min), 30 cycles consisted of 1 min at 94 °C for denaturation, 40 s at 58 °C for annealing and 150 s at 72 °C for elongation, followed 10 min at 72 °C final extension. Target amplification was confirmed by electrophoresis in 1 % agarose. The PCR products were sequenced and compared with 16S rRNA gene sequences present in the NCBI GenBank.

Based on a literature review, a percentage of the bacterial isolates were selected to produce IAA, mineral phosphorus solubilization, and greenhouse plant inoculation tests. For phosphorus solubilization, Pikovskaya agar medium (PVK) with

recolectaron cinco muestras de suelo de la rizósfera de la planta de caña de azúcar. Las muestras se recolectaron a una profundidad de 30 cm, estuvo compuesta por cinco puntos en cada lote, posteriormente se homogeneizaron y secaron a la sombra. El aislamiento bacteriano consistió en utilizar 1 g de suelo diluido en solución salina isotónica estéril, se colocaron 100  $\mu$ L de la dilución por triplicado en placas de Petri estériles con medio de cultivo y se incubaron a 30 °C durante 48 horas. La selección de las colonias se realizó por morfología y el recuento de las colonias se realizó por el método de Swanson *et al.* (2001), se utilizaron tres medios de cultivo, Luria-Bertani (LB), agar rojo congo y agar papa dextrosa (PDA) para el aislamiento bacteriano (Berkhoff y Vinal, 1986).

**Identificación molecular.** Se utilizó el protocolo PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent de Applied Biosystems para ADN (Mullis y Faloona, 1987), el protocolo permitió realizar una PCR directamente. El gen de ARNr 16S se amplificó utilizando el cebador universal Sx-(AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y Ay-(ACCTTGTTACGACTT) (Naveed *et al.*, 2014). El ciclo de amplificación incluyó una desnaturalización inicial (94 °C, 5 min), 30 ciclos consistieron en 1 min a 94 °C para la desnaturalización, 40 s a 58 °C para el recocido y 150 s a 72 °C para el alargamiento, seguidos de 10 min a Extensión final 72 °C. La amplificación diana se confirmó mediante electroforesis en agarosa al 1 %. Los productos de la PCR se secuenciaron y compararon con las

purple bromocresol solution was used as culture pH indicator (changes from violet to yellow), which indicates the medium acidification. 10  $\mu$ L of each strain were cultured in PVK medium plates and incubated for 7 days at 30 °C. The appearance of a clear zone around the colony was considered as its phosphate solubility capacity. The phosphorus solubility index (SI) was calculated from relationship between the diameter of colony and halo zone (Nopparat *et al.*, 2009).

#### Biochemical characterization.

In IAA analysis, the strains were grown in LB liquid medium for 24 and 48 h and filtered with 0.45  $\mu$ m nylon membranes (Millipore), each sample was composed of 3 mL deionized water and 3 mL of a suspension  $1.10^6$  cells.mL<sup>-1</sup>. HPLC analysis was performed by injecting 20  $\mu$ L of each filtered sample and as a standard IAA solution. All sample analysis was transformed in mobile phase 70/30 (700 mL of phosphate solution and 300 mL of acetonitrile) with pH 3.2, a flow rate 1 mL.min<sup>-1</sup> for 25 min at 30 °C, UV light detector at 220 nm and column ultra-pore of 150\*4.6mm (Arora and Bae, 2014).

**Greenhouse test.** The effect as bio stimulators of plant growth of nine isolated bacteria selected for their production of IAA a phosphorus solubilization was evaluated in a greenhouse in 20 seedlings sugarcane variety CP 72-2086 (*Bacillus aryabhatai*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. simplex*, *B. subtilis*, *Brevundimonas aurantiaca*, *Ensifer adhaerens*, *Pseudomonas* sp. and control). The analysis was

secuencias del gen del ARNr 16S presentes en el NCBI GenBank.

En base a una revisión de la literatura, se seleccionó un porcentaje de los aislados bacterianos para producir IAA, solubilización de fósforo mineral e inoculación de plantas de invernadero. Para la solubilización del fósforo se utilizó medio de agar Pikovskaya (PVK) con solución de bromocresol púrpura como indicador del pH del cultivo (cambios de violeta a amarillo), lo que indica la acidificación del medio. Se cultivaron 10  $\mu$ L de cada cepa en placas de medio PVK y se incubaron durante 7 días a 30 °C. La aparición de una zona clara alrededor de la colonia se consideró como su capacidad de solubilidad de fosfato. El índice de solubilidad del fósforo (SI) se calculó a partir de la relación entre el diámetro de la colonia y la zona del halo (Nopparat *et al.*, 2009).

#### Caracterización bioquímica.

En el análisis IAA, las cepas se cultivaron en medio líquido LB durante 24 y 48 h y se filtraron con membranas de nylon de 0,45  $\mu$ m (Millipore), cada muestra estuvo compuesta por 3 mL de agua desionizada y 3 mL de una suspensión de  $1.10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. El análisis por HPLC se realizó inyectando 20  $\mu$ L de cada muestra filtrada y como una solución estándar de IAA. Todo el análisis de la muestra se transformó en fase móvil 70/30 (700 mL de solución de fosfato y 300 mL de acetonitrilo) con pH 3,2, un caudal de 1 mL.min<sup>-1</sup> durante 25 min a 30 °C, detector de luz UV a 220 nm y columna ultra-pore de 150\*4,6 mm (Arora y Bae, 2014).

**Prueba de invernadero.** Se evaluó el efecto como bioestimuladores

carried in El Mante municipality in Tamaulipas state, Mexico (latitude N 22°74'78.30" and length E 98°98'27.99"). Each sugarcane seedling of cultivar CP 72-2086 was transplanted in bags with substrate composted cachaza (six kilograms) 10 cm to depth. One milliliter each strain bacterial was applied to root. The Chlorophyll and nitrogen content and shoots number were evaluated.

**Statistical analysis and experimental design.** For the bacterial evaluation in production phosphorus solubilization and greenhouse test, a completely randomized block experimental design was used with three repetitions for phosphorus solubilization and 20 repetitions (plants) for the greenhouse test. For the two evaluations an ANOVA and Tukey's means test were applicable ( $P = 0.05$ ) in the software InfoStat v2019 (Di Rienzo *et al.*, 2019). For the phylogenetic tree was constructed with the Kimura 2-parameters method (Kimura, 1980) and the maximum probability with a resampling of 10,000 repetitions (Felsenstein, 1985) and the MEGA V6.0 software was used.

## Results and discussion

**Bacterial diversity.** Morphology isolation allowed identification of 121 pure isolates from sugarcane rhizosphere, identification based on 16S rRNA gene allowed identification of 38 species grouped in nine genera and three phyla, Actinobacteria, Proteobacteria and Firmicutes. Of total species identified, the

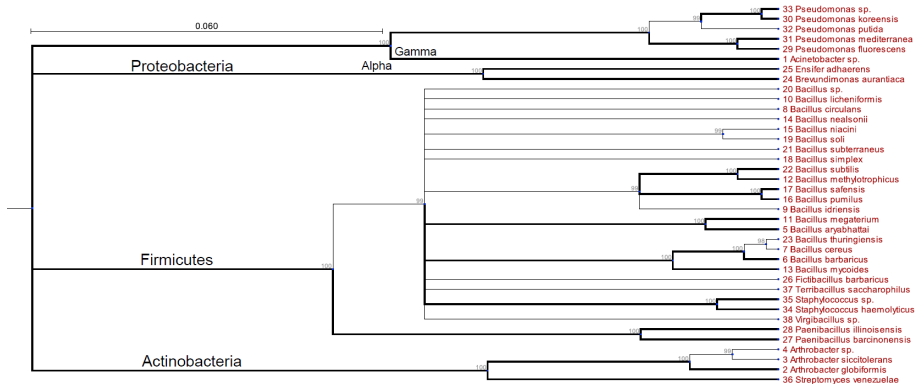
del crecimiento vegetal de nueve bacterias aisladas seleccionadas para su producción de IAA a solubilización de fósforo en invernadero en 20 plántulas de caña de azúcar variedad CP 72-2086 (*Bacillus aryabhatai*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. simplex*, *B. subtilis*, *Brevundimonas aurantiaca*, *Ensifer adhaerens*, *Pseudomonas* sp. y control). El análisis se realizó en el municipio El Mante en el estado de Tamaulipas, México (latitud N 22°74'78,30" y longitud E 98°98 '27,99"). Cada plántula de caña de azúcar del cultivar CP 72-2086 se transplantó en bolsas con sustrato compostado de cachaza (seis kilogramos) a 10 cm de profundidad. Se aplicó a la raíz un mililitro de cada cepa bacteriana. Se evaluó el contenido de clorofila y nitrógeno y el número de brotes.

**Análisis estadístico y diseño experimental.** Para la evaluación bacteriana en producción de solubilización de fósforo y prueba de invernadero, se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar con tres repeticiones para la solubilización de fósforo y 20 repeticiones (plantas) para la prueba de invernadero. Para las dos evaluaciones se aplicaron ANAVAR y prueba de medias de Tukey ( $P = 0,05$ ) en el software InfoStat v2019 (Di Rienzo *et al.*, 2019). Para el árbol filogenético se construyó con el método de 2 parámetros de Kimura (Kimura, 1980) y máxima probabilidad con un remuestreo de 10.000 repeticiones (Felsenstein, 1985) y el software MEGA V6.0.

genera *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Arthrobacter* grouped largest number of species. At phylum level, the phylum Firmicutes grouped largest number of species (26), Proteobacteria eight and Actinobacteria four species (figure 1).

## Resultados y discusión

**Diversidad bacteriana.** El aislamiento morfológico permitió identificar 121 aislados puros de la rizósfera de la caña de azúcar, la



**Figure 1. Phylogenetic relationship of 16S rRNA gene in bacteria isolated from sugarcane rhizosphere grown in southern Tamaulipas state, Mexico.**

**Figura 1. Relación filogenética del gen 16S rRNA en bacterias aisladas de la rizosfera de caña de azúcar cultivada en el sur del estado de Tamaulipas, México.**

The results in bacterial diversity found in this work coincide with that reported by Dhanraj (2013), who found a similar number of phyla and bacterial genera in the rhizosphere of sugarcane and that reported by Cordero *et al.* (2020) in the rhizosphere of the other crops as canola, wheat, field pea and lentil. In this work, 38 species located in three phyla were identified, Actinobacteria, Proteobacteria and Firmicutes, 50 % of the bacteria belonged to the genus *Bacillus* within the phylum Firmicutes. Pisa *et al.* (2011), found in their investigation

identificación basada en el gen 16S rRNA permitió identificar 38 especies agrupadas en nueve géneros y tres filos, Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes. Del total de especies identificadas, los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Arthrobacter* agruparon el mayor número de especies. A nivel de filo, el filo Firmicutes agrupó el mayor número de especies (26), Proteobacteria ocho y Actinobacteria cuatro especies (figura 1).

Los resultados en diversidad bacteriana encontrados en este trabajo coinciden con lo reportado por Dhanraj



of sugarcane rhizosphere that genus *Bacillus* is present in 19.7 % more than other genera found and as well as Männistö *et al.* (2013), who reported that *Bacillus* genus had a greater presence in soils cultivated with crops of commercial interest (Cordero *et al.*, 2020).

The wide presence of genus *Bacillus* in soils cultivated with sugarcane, may be related to fact that genus *Bacillus* species could produce spores, which allows each species to tolerate unfavorable environmental conditions compared to other genera (Galperin, 2013). Furthermore, it is known that *Bacillus* strains are producers lipopeptide biosurfactants of surfactin, iturin and fengycin families that demonstrate biological activity with a synergistic mode of action (Heryania and Dharma Putrab, 2017).

In addition, surfactin shows antibacterial, antiviral, antiparasitic properties and triggers formation of biofilms, which are essential for root colonization, Iturin and fengycin exhibit antifungal activity against a wide range of yeast and filamentous fungi, together stimulate an induced systemic response (ISR) in host plants, for what are considered microorganisms with industrial and agricultural potential (Lim *et al.*, 2017).

**Phosphorus solubilization.** Of 38 species of detected bacteria, only one isolate per species was analyzed for phosphorus solubilization, the result showed that less than 50 % of the strains can solubilize insoluble phosphorus, the same result was

(2013), quien encontró un número similar de phyla y géneros bacterianos en la rizosfera de la caña de azúcar y al reportado por Cordero *et al.* (2020) en la rizósfera de los otros cultivos como canola, trigo, guisante y lentejas. En este trabajo se identificaron 38 especies ubicadas en tres phyla, Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes, el 50 % de las bacterias pertenecían al género *Bacillus* dentro del Phylum Firmicutes. Pisa *et al.* (2011), encontraron en su investigación de la rizósfera de la caña de azúcar que el género *Bacillus* está presente en un 19,7 % más que otros géneros encontrados y al igual que Männistö *et al.* (2013), quienes reportaron que el género *Bacillus* tuvo una mayor presencia en suelos cultivados con cultivos de interés comercial (Cordero *et al.*, 2020).

La amplia presencia del género *Bacillus* en suelos cultivados con caña de azúcar, puede estar relacionada con el hecho de que las especies del género *Bacillus* podrían producir esporas, lo que permite que cada especie tolere condiciones ambientales desfavorables en comparación con otros géneros (Galperin, 2013). Además, se sabe que las cepas de *Bacillus* son productoras de biosurfactantes lipopéptidos de las familias de surfactina, iturina y fengycina que demuestran actividad biológica con un modo de acción sinérgico (Heryania y Dharma Putrab, 2017).

Además, la surfactina muestra propiedades antibacterianas, antivirales, antiparasitarias y desencadena la formación de biopelículas, que son esenciales para

reported by Mohammadi (2012), who observed a lower efficacy than 50 % in solubilization insoluble phosphorus. The variance analysis was highly significant for phosphorus solubilization time (24, 48 and 72 h) and treatments (bacterial) (table 1).

Tukey's test (P = 0.05) showed that *Pseudomonas mediterranea* (21.6 mm) had highest phosphorus solubilization, followed by *Bacillus aryabhattai* (14.4 mm) (table 2).

la colonización de raíces, Iturin y fengycin exhiben actividad antifúngica contra una amplia gama de levaduras y hongos filamentosos, juntos estimulan una respuesta sistémica inducida (ISR) en plantas hospedantes, por lo que se consideran microorganismos con potencial industrial y agrícola (Lim *et al.*, 2017).

**Solubilización de fósforo.** De 38 especies de bacterias detectadas, solo se analizó un aislado por

**Table 1. Analysis of variance of phosphorus solubilization test in bacteria isolated from sugarcane rhizosphere in Tamaulipas state, Mexico.**

**Cuadro 1. Análisis de varianza de la prueba de solubilización de fósforo en bacterias aisladas de la rizósfera de la caña de azúcar en el estado de Tamaulipas, México.**

Variationsource	Freedom degrees	Squares sum	Middle squares	f calc.	prob.
Treatments	125	134.75	8.93	5.84	0.0001**
Repetitions	3	2.71	0.90	0.59	0.624 ns
Time	1	1915.15	1915.15	1244.6	0.001**
Treat*Rep	45	668.38	14.85	9.65	0.001**
Time*Rep	15	1235.84	82.38	53.55	0.001**
Error	112	172.33	1.53		
CV	12 %				

CV= Coefficient of variation, ns= no significance (P = 0.01).

CV = Coeficiente de variación, ns = sin significancia (P = 0,01).

This is important since phosphorus is one of the essential macroelements necessary for plant growth and development, however, there is only a small fraction of phosphorus in the soil solution (1 ppm or 0.1 %) (Awais *et al.*, 2017). The phosphate-solubilizing bacteria (PSB) have ability to solubilize insoluble phosphorus and make it available to plant roots for

especie para la solubilización de fósforo, el resultado mostró que menos del 50 % de las cepas pueden solubilizar fósforo insoluble, el mismo resultado fue reportado por Mohammadi (2012), quien observó una eficacia menor al 50 % en la solubilización del fósforo insoluble. El análisis de varianza fue altamente significativo para el

absorption (Awais *et al.*, 2017), they are predominately concentrated in rhizosphere (Chen *et al.*, 2006).

tiempo de solubilización del fósforo (24, 48 y 72 h) y los tratamientos (bacterianos) (cuadro 1).

**Table 2. Tukey's means comparison (P = 0.05) of phosphorus solubilization bacterial isolated from sugarcane rhizosphere.**

**Cuadro 2. Comparación de medias de Tukey (P = 0,05) de bacterias solubilizadoras de fósforo aisladas de la rizosfera de la caña de azúcar.**

Number	Treatments	Average
T12	<i>Pseudomonas mediterranea</i>	21.6 <sup>a</sup> ± 1.38
T1	<i>Bacillus aryabhatai</i>	14.4 <sup>b</sup> ± 1.38
T2	<i>Bacillus megaterium</i>	14.1 <sup>b</sup> ± 1.38
T11	<i>Pseudomonas koreensis</i>	13.7 <sup>b</sup> ± 1.38
T14	<i>Pseudomonas sp.</i>	11.5 <sup>c</sup> ± 1.38
T13	<i>Pseudomonas putida</i>	11.1 <sup>c</sup> ± 1.38
T3	<i>Bacillus mycoides</i>	09.6 <sup>d</sup> ± 1.38
T7	<i>Ensifer adhaerens</i>	09.5 <sup>d</sup> ± 1.38
T4	<i>Bacillus pumilus</i>	09.0 <sup>e</sup> ± 1.38
T10	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	08.8 <sup>e</sup> ± 1.38
T6	<i>Bacillus thuringensis</i>	08.3 <sup>f</sup> ± 1.38
T5	<i>Bacillus safensis</i>	07.3 <sup>f</sup> ± 1.38
T9	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	07.3 <sup>f</sup> ± 1.38
T8	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	05.0 <sup>f</sup> ± 1.38
T15	<i>Streptomyces venezuelae</i>	03.8 <sup>h</sup> ± 1.38
T16	<i>Terribacillus saccharophilus</i>	03.3 <sup>h</sup> ± 1.38

a, b, c, d, e, f, g, h Means with different letters are significantly different (P = 0.05).

a, b, c, d, e, f, g, h Medias con letras diferentes son significativamente diferentes (P = 0,05).

In these analyses, 42% of bacteria in sugarcane rhizosphere have ability to solubilize insoluble phosphorus, mainly *Bacillus* and *Pseudomonas* genera, like that observed by Mohammadi (2012), PSB bacteria belong to genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* and

La prueba de Tukey (P = 0,05) mostró que *Pseudomonas mediterranea* (21,6 mm) tuvo la mayor solubilización de fósforo, seguida por *Bacillus aryabhatai* (14,4 mm) (cuadro 2).

Esto es importante ya que el fósforo es uno de los macroelementos

*Enterobacter*, these bacteria can be used as biofertilizers (de Santi Ferrara *et al.*, 2012). Biofertilizers represent a sustainable solution to improve plant growth, nutrition, root growth, productivity, and response to stress factors (Sharma *et al.*, 2013; Anand *et al.*, 2016).

**HPLC analysis.** HPLC analysis results showed that *Bacillus aryabhatai* (6.0 ppm), *Bacillus safensis* (50.9 ppm), *Bacillus pumilus* (5.8 ppm) and *Ensifer adhaerens* (5.6 ppm) had highest production of 3-indoleacetic acid (IAA). These results agree with those reported by Lee *et al.* (2012), who reported that *Bacillus aryabhatai* strain LS15 generated highest production IAA and Souza (2016) reported that *Ensifer adhaerens* have ability to fix atmospheric nitrogen and IAA production.

Different *Rhizobacteria* genera have ability to produce and secrete chemical compounds regulate and promote plant growth (Ashraf *et al.*, 2011). IAA-producing bacteria have longer survival and colonize plant roots better than other bacteria (Etesami *et al.*, 2015), weakening the plant defense mechanisms. In these results, *Bacillus* genus had a great capacity to produce IAA which may be due to ability to release growth-promoting substances and have a better capacity for adaptation and colonization of sugarcane rhizosphere in soils of Tamaulipas state, such as was observed by de Santi Ferrara *et al.* (2012). Production of phytohormones, such as auxins or gibberellins, is a direct mechanism that is used by

esenciales necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas, sin embargo, solo hay una pequeña fracción de fósforo en la solución del suelo (1 ppm o 0,1 %) (Awais *et al.*, 2017). Las bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB) tienen la capacidad de solubilizar el fósforo insoluble y ponerlo a disposición de las raíces de las plantas para su absorción (Awais *et al.*, 2017), se concentran predominantemente en la rizósfera (Chen *et al.*, 2006).

En estos análisis, el 42 % de las bacterias en la rizósfera de la caña de azúcar tienen capacidad para solubilizar fósforo insoluble, principalmente los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, como el observado por Mohammadi (2012), las bacterias PSB pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Enterobacter*, estas bacterias pueden ser utilizados como biofertilizantes (de Santi Ferrara *et al.*, 2012). Los biofertilizantes representan una solución sostenible para mejorar el crecimiento de las plantas, la nutrición, el crecimiento de las raíces, la productividad y la respuesta a los factores de estrés (Sharma *et al.*, 2013; Anand *et al.*, 2016).

**Análisis por HPLC.** Los resultados del análisis de HPLC mostraron que *Bacillus aryabhatai* (6,0 ppm), *Bacillus safensis* (50,9 ppm), *Bacillus pumilus* (5,8 ppm) y *Ensifer adhaerens* (5,6 ppm) tuvieron la mayor producción de ácido 3-indolacético (IAA). Estos resultados concuerdan con los reportados por Lee *et al.* (2012), quienes informaron que la cepa LS15 de *Bacillus aryabhatai*

PGR microorganisms. IAA is one of the most physiologically active auxins which controls many physiological processes including stimulation of cell division, cell elongation, cell differentiation, light and gravitational responses, and regulation of leaf fall and fruit ripening (Massena and dos Santos, 2015).

The bacterial evaluation under greenhouse conditions, the chlorophyll nitrogen amount in leaves and shoots number per plant showed highly significant differences in ANOVA analysis (table 3).

generó la mayor producción de IAA y Souza (2016) informaron que *Ensifer adhaerens* tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y la producción de IAA.

Los diferentes géneros de Rhizobacteria tienen la capacidad de producir y secretar compuestos químicos que regulan y promueven el crecimiento de las plantas (Ashraf *et al.*, 2011). Las bacterias productoras de IAA tienen una supervivencia más prolongada y colonizan las raíces de las plantas mejor que otras bacterias (Etesami *et al.*, 2015), lo que debilita

**Table 3. Analysis of variance for amount of nitrogen, chlorophyll and number of shoots traits in sugarcane cultivar CP 72-2086 inoculated with bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane in Tamaulipas state, Mexico.**

**Cuadro 3. Análisis de varianza para las características cantidad de nitrógeno, clorofila y número de brotes en el cultivar de caña de azúcar CP 72-2086 inoculado con bacterias aisladas de la rizósfera de la caña de azúcar en el estado de Tamaulipas, México.**

Variation source	Chlorophyll content	Nitrogen content	Shoot number
Treatments	2975.64**	4045.72**	0.0022**
Repetitions	67.70 <sup>ns</sup>	0.588 <sup>ns</sup>	0.9052 <sup>ns</sup>
Error	35.00	15.46	0.0194
CV (%)	11.00	10.00	10.00

CV = Coefficient of variation; ns= no significance (P = 0.01).

CV = coeficiente de variación; ns = sin importancia (P = 0,01).

Tukey's test (P = 0.05) showed that *Ensifer adhaerens* and *Bacillus megaterium* species presented highest chlorophyll and nitrogen averages in cultivar sugarcane CP 72-2086. *Bacillus megaterium* species

los mecanismos de defensa de las plantas. En estos resultados, el género *Bacillus* tuvo una gran capacidad de producir IAA lo cual puede deberse a la capacidad de liberar sustancias promotoras del crecimiento y tener

presented two shoots per plant that represented highest value, showing significant biostimulant behavior (table 4). Situation that is presented in the work of Cook *et al.* (2011), in pot growth of sugarcane plants inoculated with the species *Pseudomonas luteola*, *P. fluorescens* N50, *Ochrobactrum anthropi* N208 and *Stenotrophomonas maltophilia* 79 had the highest leaf area indices and growth rates.

una mejor capacidad de adaptación y colonización de la rizósfera de la caña de azúcar en suelos del estado de Tamaulipas, como lo observó de Santi Ferrara *et al.* (2012). La producción de fitohormonas, como auxinas o giberelinas, es un mecanismo directo que utilizan los microorganismos PGR. IAA es una de las auxinas más fisiológicamente activas que controla muchos procesos fisiológicos, incluida

**Table 4. Tukey’s means comparison (P = 0.05) of amount of nitrogen, chlorophyll and number of shoots traits in sugarcane cultivar CP 72-2086 inoculated with bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane in Tamaulipas state, Mexico.**

**Cuadro 4. Comparación de medias de Tukey (P = 0,05) para las características de cantidad de nitrógeno, clorofila y número de brotes en el cultivar de caña de azúcar CP 72-2086 inoculado con bacterias aisladas de la rizosfera de la caña de azúcar en el estado de Tamaulipas, México.**

Number	Treatments	Chlorophyll content	Nitrogen content	Shoot number
T1	<i>Bacillus aryabhatai</i>	37.8 <sup>c</sup> ± 1.03	1.18 <sup>b</sup> ± 0.08	2 <sup>a</sup> ± 0.18
T2	<i>Bacillus licheniformis</i>	45.8 <sup>a</sup> ± 1.03	2.38 <sup>a</sup> ± 0.08	1 <sup>b</sup> ± 0.18
T3	<i>Bacillus megaterium</i>	48.0 <sup>a</sup> ± 1.03	2.53 <sup>a</sup> ± 0.08	2 <sup>a</sup> ± 0.18
T4	<i>Bacillus pumilus</i>	35.2 <sup>d</sup> ± 1.03	1.78 <sup>c</sup> ± 0.08	2 <sup>a</sup> ± 0.18
T5	<i>Bacillus simplex</i>	38.6 <sup>c</sup> ± 1.03	1.80 <sup>c</sup> ± 0.08	2 <sup>a</sup> ± 0.18
T6	<i>Bacillus subtilis</i>	43.6 <sup>b</sup> ± 1.03	2.30 <sup>a</sup> ± 0.08	1 <sup>b</sup> ± 0.18
T7	<i>Bacillus safensis</i>	44.9 <sup>b</sup> ± 1.03	2.37 <sup>a</sup> ± 0.08	1 <sup>b</sup> ± 0.18
T8	<i>Ensifer adhaerens</i>	48.1 <sup>a</sup> ± 1.03	2.50 <sup>a</sup> ± 0.08	1 <sup>b</sup> ± 0.18
T9	<i>Pseudomonas</i>	30.0 <sup>b</sup> ± 1.03	2.49 <sup>a</sup> ± 0.08	1 <sup>b</sup> ± 0.18
T10	Control	48.0 <sup>a</sup> ± 1.03	1.05 <sup>b</sup> ± 0.08	4 <sup>a</sup> ± 0.18

<sup>a, b, c, d</sup>Means with different letters are significantly different (P = 0.05).

<sup>a, b, c, d</sup>Medias con letras diferentes son significativamente diferentes (P = 0,05).

Biological evaluations by Castellanos-González *et al.* (2016), showed responses to biofertilization with the combination of cachaça and

la estimulación de la división celular, el alargamiento celular, la diferenciación celular, las respuestas lumínicas y gravitacionales y la regulación de la

phosphate rock with commercial biofertilizers EcoMic® and Azotofos®, achieving increases in the number of shoots in sugarcane seedlings. Gómez *et al.* (2019), also with inoculation of the biofertilizer NITROFIX® provoked a stimulating response on the radical growth of the evaluated varieties of sugarcane.

## Conclusions

The isolation and bacterial identification by the 16S rRNA gene of the rhizosphere of the sugarcane variety CP 72-2086 cultivated in the state of Tamaulipas, Mexico, identified in greater proportion species of the genus *Bacillus*.

The analysis of *in vitro* parameters of dissolution of phosphorus and IAA and the measured parameters of the amount of chlorophyll, nitrogen and shoots detected in the greenhouse bacterial inoculation in the sugarcane variety CP 72-2086, indicated that *Bacillus megaterium* and *Ensifer adhaerens* had the highest performance, postulating these isolates to future evaluations in sugarcane cultivated in the state of Tamaulipas, Mexico to evaluate their effect as possible biofertilizers in the production of sugarcane.

## Acknowledgment

Conacyt-FOMIX-Tamaulipas: Tamaulipas Key: 00000000019961, and Instituto Politécnico Nacional.

*End of English Version*

---

caída de las hojas y la maduración del fruto (Massena y dos Santos, 2015)

La evaluación bacteriana en condiciones de invernadero, la cantidad de nitrógeno clorofílico en hojas y el número de brotes por planta mostró diferencias altamente significativas en el análisis ANAVAR (cuadro 3).

La prueba de Tukey (P = 0,05) mostró que las especies de *Ensifer adhaerens* y *Bacillus megaterium* presentaron los promedios más altos de clorofila y nitrógeno en el cultivar de caña de azúcar CP 72-2086. Las especies de *Bacillus megaterium* presentaron dos brotes por planta que representaron el mayor valor, mostrando un comportamiento bioestimulante significativo (cuadro 4). Situación que se presenta en el trabajo de Cook *et al.* (2011), en macetas de plantas de caña de azúcar inoculadas con las especies *Pseudomonas luteola*, *P. fluorescens* N50, *Ochrobactrum anthropi* N208 y *Stenotrophomonas maltophilia* 79 tuvieron los índices de área foliar y tasas de crecimiento más altos.

Evaluaciones biológicas de Castellanos-González *et al.* (2016), mostraron respuestas a la biofertilización con la combinación de cacheça y roca fosfórica con biofertilizantes comerciales EcoMic® y Azotofos®, logrando incrementos en el número de brotes en plántulas de caña de azúcar. Gómez *et al.* (2019), también con la inoculación del biofertilizante NITROFIX® provocó una respuesta estimulante sobre el crecimiento

radical de las variedades evaluadas de caña de azúcar.

## Conclusiones

El aislamiento e identificación bacteriana por el gen 16S rRNA de la rizósfera de la variedad de caña de azúcar CP 72-2086 cultivada en el estado de Tamaulipas, México, identificó en mayor proporción especies del género *Bacillus*.

El análisis de los parámetros *in vitro* de disolución de fósforo e IAA y los parámetros medidos de la cantidad de clorofila, nitrógeno y brotes detectados en la inoculación bacteriana en invernadero en la variedad de caña de azúcar CP 72-2086, indicó que *Bacillus megaterium* y *Ensifer adhaerens* presentaron los mayores niveles de desempeño, postulando estos aislados para futuras evaluaciones en caña de azúcar cultivada en el estado de Tamaulipas, México para evaluar su efecto como posibles biofertilizantes en la producción de caña de azúcar.

## Agradecimiento

Conacyt-FOMIX-Tamaulipas: Código Tamaulipas: 00000000019961, e Instituto Politécnico Nacional.

## Literature cited

Anand, K., B. Kumari, and M. M. Anwar. 2016. Phosphate solubilizing microbes, an effective and alternative approach as biofertilizers. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 82, 37-40. <https://cutt.ly/rnajSSI>

Arora, P. K. and H. Bae. 2014. Identification of new metabolites of bacterial transformation of indole by gas chromatography-mass spectrometry

and high performance liquid chromatography. *Int. J. Anal. Chem.* 2014, Article ID 239641, 5 pages, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/239641>

Ashraf, M., M. Rasool, and M. Mirza. 2011. Nitrogen fixation and indole acetic acid production potential of bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane *Saccharum officinarum* L. *Adv. Biol. Res.* 56: 348-355. <https://cutt.ly/4najF9K>

Awais, M., M. Tariq, A. Ali, Q. Ali, A. Khan, B. Tabassum, I. Nasir, and T. Husnain. 2017. Isolation, characterization, and inter-relationship of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of sugarcane and rice. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 11: 312-321. <https://doi.org/10.1016/j.beab.2017.07.018>

Berkhoff, H. A. and A. C. Vinal. 1986. Congo red medium to distinguish between invasive and non-invasive *Escherichia coli* pathogenic for poultry. *Avian Dis.* 30(1): 117-121. <https://cutt.ly/7najJGA>

Bhattacharyya, P. N. and D. K. Jha, 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria PGPR, emergence in agriculture. *World J Microb Biot.* 28: 1327-1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>

Castellanos-González, L., M. Abreus-Jiménez, C. N. Silva-Campos, R. Rivera-Espinosa, I. Fuentes-Romero, E. Parets-Selva, R. de Mello-Prado, and M. Romero. 2016. Efecto de la adición de cachaza, roca fosfórica y biofertilizantes en el suelo sobre el contenido de fósforo y el desarrollo de plántulas de caña de azúcar. *Cult. Trop.* 37(4): 145-151. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.17308.08324>

Castro-Nava, S., J. A. López-Santillán y F. Briones-Encinia. 2010. Retos y perspectivas de la caña de azúcar en Tamaulipas. *CienciaUAT.* 44: 38-43. <https://cutt.ly/JnajZgr>

Chen, Y. P., P. D. Rekha, A. B. Arun, F. T. Shen, W. A. Lai and C. C. Young. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil. Ecol.* 34(1), 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002>



- Cordero, J., J. R. de Freitas, and J. J. Germida. 2020. Bacterial microbiome associated with the rhizosphere and root interior of crops in Saskatchewan, Canada. *Can. J. Microbiol.* 661: 71-85. <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0330>
- Criollo, P. J., M. Obando, L. Sánchez, y R. Bonilla. 2012. Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal PGPR asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. *Corpoica Cienc. y Tecnol. Agropecu.* 13(2): 189-195. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol13\\_num2\\_art:254](https://doi.org/10.21930/rcta.vol13_num2_art:254)
- de Santi Ferrara, F. I., Z. Machado, H. H. Soto, E. I. Segal and H. Ramos. 2012. Endophytic and rhizospheric *Enterobacteria* isolated from sugarcane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. *Plant Soil.* 353: 409-417. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1042-1>
- Dhanraj, B. N. 2013. Bacterial diversity in sugarcane *Saccharum officinarum* L. rhizosphere of saline soil. *Int. Res. J. Biol. Sci.* 22: 60-64. <https://cutt.ly/5nacKSS>
- Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. González, M. Tablada y C. W. Robledo. 2019. InfoStat versión 2019. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <https://cutt.ly/InajNsM>
- Etesami, H., H. A. Alikhani and H. M. Hosseini. 2015. Indole-3-acetic acid IAA production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX.* 2: 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2015.02.008>
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies, An approach using the bootstrap. *Evolution.* 394: 783-791. <https://doi.org/10.2307/2408678>
- Galperin, M. Y. 2013. Genome diversity of spore-forming firmicutes. *Microbiol. Spectr.* 12: TBS-0015-2012. <https://doi.org/10.1128/microbiolspectrum.TBS-0015-2012>
- Gómez, E., Y. Guevara, A. N. San Juan, T. Lemes, M. Pérez and Y. Cutiño. 2019. Efecto del inoculante NITROFIX® sobre el desarrollo radical en tres variedades de caña de azúcar. *Cent. Agric.* 464: 61-64. <https://cutt.ly/Onakt1s>
- Hernández-Mendoza, J. L., J. D. Quiroz-Velásquez, J. G. García-Olivares, C. Lizarazo-Ortega, M. C. Martínez-Rodríguez y M. A. Ibarra-Rodríguez. 2018. Análisis económico del uso de biofertilizantes comerciales en el cultivo de sorgo. *Rev. Fac. Agron (LUZ).* 35(4): 496-513. <https://cutt.ly/RnakbeF>
- Heryania, H. and M. Dharma-Putrab. 2017. Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus* sp. *Electron. J. Biotechnol.* 27: 49-54. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.03.005>
- Kimura, M. A. 1980. Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2017.05.037>
- Lee, S., J. O. Ka, and H. G. Song. 2012. Growth promotion of *Xanthium italicum* by application of rhizobacterial isolates of *Bacillus aryabhatai* in microcosm soil. *J. Microbiol.* 501: 45-49. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1415-z>
- Lim, S. M., M. Y. Yoon, G. J. Choi, Y. H. Choi, K. S. Jang, T. S. Shin, H. W. Park, N. H. Yu, Y. H. Kim and J. C. Kim. 2017. Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. *Plant Pathol. J.* 335: 488-498. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.04.2017.0073>
- Männistö, M. K., E. Kurhela, M. Tirola and M. M. Häggblom. 2013. Acidobacteria dominate the active bacterial communities of Arctic tundra with widely divergent winter-time snow accumulation and soil temperatures. *FEMS Microbiol. Ecol.* 841: 47-59. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12035>










- Massena, V. and K. dos Santos. 2015. Nitrogen fixing bacteria in the family Acetobacteraceae and their role in agricultura. *J. Basic Microbiol.* 558: 931-949. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400898>
- Mohammadi, K. 2012. Phosphorus solubilizing bacteria, occurrence, mechanisms, and their role in crop production. *Resources and Environment*, 2: 80-85.
- Momose, A., N. Ohtake, K. Sueyoshi, T. Sato, Y. Nakanishi, S. Akao and T. Ohyama. 2009. Nitrogen fixation and translocation in young sugarcane *Saccharum officinarum* L. plants associated with endophytic nitrogen-fixing bacteria. *Microbes Environ.* 243: 224-230. <https://doi.org/10.1264/j sme2.me09105>
- Morgan, J. A. W., G. D. Bending, and P. J. White. 2005. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56(417): 1729-1739. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri205>
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350. <https://doi.org/10.1016/0076-68798755023-6>
- Naveed, M., S. Mubeen, S. U. Khan, I. Ahmed, N. Khalid, H. A. Rasul-Suleria, A. Bano, and A. S. Mumtaz. 2014. Identification and characterization of rhizospheric microbial diversity by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Braz. J. Microbiol.* 453: 985-993. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000300031>
- Nopparat, C., M. Jatupornpipat, and A. Rittiboon. 2009. Optimization of the phosphate-solubilizing fungus, *Aspergillus japonicus* SA22P3406, in solid-state cultivation by response surface methodology. *Witthayasan Kasetsat.* 435: 172-181. <https://cutt.ly/enach2n>
- Pisa, G., G. Magnani, H. Weber, E. M. Souza, H. Faoro, R. A. Monteiro, E. Daros, V. Baura, J. P. Besspalhok, F. O. Pedrosa and L. M. Cruz. 2011. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 4412: 1215-1221. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2011007500148>
- Quecine, M. C., W. L. Araújo, P. B. Rossetto, A. Ferreira, S. Tsui, P. T. Lacava, M. Mondin, J. L. Azevedo, and A. A. Pizzirani-Kleiner. 2012. Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 7821: 7511-7518. <https://doi.org/10.1128/AEM.00836-12>
- Saharan, B. S. and V. Nehra. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria, A critical review. *LSMR.* 1-30. <https://cutt.ly/HnaxyPZ>
- Serna-Cock, L., C. Arias-García and L. J. Valencia Hernández. 2011. Efecto de la biofertilización sobre el crecimiento en maceta de plantas de caña de azúcar *Saccharum officinarum* L. *Biotecnol. sector agropecuario agroind.* 92: 85-95. <https://cutt.ly/gnavuV8>
- Sharma S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H. and Gobi, T. A. 2013. Phosphate solubilizing microbes, sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus.* 2: 587. <https://cutt.ly/OnalT8X>
- Solanki, M. K., Z. Wang, F. Y. Wang, Ch. N. Li, T. J. Lan, R. K. Singh, P. Singh, L. T. Yang and Y. R. Li. 2017. Intercropping in sugarcane cultivation influenced the soil properties and enhanced the diversity of vital diazotrophic bacteria. *Sugar Tech.* 19: 136-147. <https://doi.org/10.1007/s12355-016-0445-y>
- Souza, A. K. 2016. Bactérias promotoras de crescimento de plantas associadas à diferentes doses de fertilização nitrogenada na cultura do trigo. *Dissertação Mestrado em Agronomia - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.* 59 p. <https://cutt.ly/VnalOhk>
- Swanson, K. M., R. L. Petran, and J. H. Hanlin. 2001. Culture methods for enumeration of microorganisms". In: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods.* 4th ed. Downs, F. P. and Ito, K. Eds. APHA. Washington. 53-67.
- Torriente, D. 2010. Aplicación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. *Perspectivas de su uso en Cuba.* *Cult. Trop.* 311: 19-26. <https://cutt.ly/ynalAED>

## Caracterización del complejo genético tracrARN-<sub>DR</sub>ARN asociado al sistema CRISPR-Cas9 del fitosimbionte *Acholeplasma palmae* descriptor: interés biotecnológico

Characterization of the tracrARN-<sub>DR</sub>ARN genetic complex associated with the CRISPR-Cas9 system of the phytosymbiont *Acholeplasma palmae*: biotechnological interest

Caracterização do complexo genético tracrARN-<sub>DR</sub>ARN associado ao sistema CRISPR-Cas9 do descritor de *Acholeplasma palmae* fitossimbionte: interesse biotecnológico

Luis Moncayo<sup>1</sup>, Alex Castro<sup>2</sup>, Diego Arcos<sup>2</sup>, Paulo Centanaro<sup>2</sup>, Diego Vaca<sup>3</sup>, Cristina Maldonado<sup>4</sup>, Aleivi Perez<sup>6</sup>, Carla Lossada<sup>7</sup>, Lenin González-Paz<sup>5,8\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Católica de Cuenca, Ecuador. Correo electrónico: [luismoncayo834@hotmail.com](mailto:luismoncayo834@hotmail.com), . <sup>2</sup>Universidad Agraria de Ecuador, Facultad de Ciencias Agrarias, Ecuador. Correo electrónico: (AC): [alcastro2010@hotmail.es](mailto:alcastro2010@hotmail.es), ; (DA): [arcosda@hotmail.com](mailto:arcosda@hotmail.com),  (PC): [pcentanaro@uagraria.edu.ec](mailto:pcentanaro@uagraria.edu.ec), . <sup>3</sup>Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Ecuador. Correo electrónico: [diegoal13@gmail.com](mailto:diegoal13@gmail.com); . <sup>4</sup>Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Babahoyo, Ecuador. Correo electrónico: [cmaldonadoc@yahoo.com](mailto:cmaldonadoc@yahoo.com) . <sup>5</sup>Laboratorio de Genética y Biología Molecular, FEC-LUZ. Zulia, Maracaibo, Venezuela. Correo electrónico: [lgonzalezpaz@gmail.com](mailto:lgonzalezpaz@lgonzalezpaz@gmail.com), . <sup>6</sup>Laboratorio de Microbiología General, FEC-LUZ. Zulia, Maracaibo, Venezuela. Correo electrónico: [aleviciencias@gmail.com](mailto:aleviciencias@gmail.com), . <sup>7</sup>Laboratorio de Caracterización Molecular y Biomolecular, Centro de Investigación y Tecnología de Materiales, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Zulia, Venezuela. 526. Correo electrónico: [lossadacarla@gmail.com](mailto:lossadacarla@gmail.com), . <sup>8</sup>Doctorado en Ciencias Agrarias, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Zulia, Venezuela.

Recibido: 14-03-2021 • Aceptado: 28-06-2021.

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [lgonzalezpaz@gmail.com](mailto:lgonzalezpaz@gmail.com)

## Resumen

La tecnología CRISPR-Cas9 usada en biotecnología vegetal se fundamenta en el empleo de nucleasas Cas9 para generar cortes precisos en el genoma y un dúplex conformado por un trans-activador CRISPR ARN (tracrARN) y un CRISPR ARN (<sub>DR</sub>ARN) los cuales son precursores del ARN guía (sgARN) rediseñado comercialmente (sgARN-Cas9) para guiar la escisión de genes. La mayoría de estas herramientas provienen de bacterias clínicas. Sin embargo, existen diversos sistemas CRISPR-Cas9 en microorganismos ambientales como los fitoendosimbiontes del género *Acholeplasma*. Pero la explotación de estos sistemas más compatibles con plantas requiere usar herramientas bioinformáticas para su predicción y estudio. Fueron identificados y caracterizados los elementos asociados al dúplex tracrARN-<sub>DR</sub>ARN en *A. palmae*. Para ello la información proteica se obtuvo del Protein Data Bank y la genómica del GenBank/NCBI. El sistema CRISPR fue estudiado con el software CRISPRfinder. Se utilizaron algoritmos de alineamiento y el software NUPACK para identificar los módulos tracrARN y <sub>DR</sub>ARN, y también diversos softwares computacionales para la caracterización genética, estructural y biofísica. Se encontró un sistema CRISPR-Cas en *A. palmae* con características de tipo II-C, así como un dúplex con regiones flexibles, termodinámicamente muy estable, presentando una energía de acoplamiento con Cas9 termodinámicamente favorecida. Estos resultados son deseables en sistemas de edición programable de genes y evidencian la posibilidad de explorar herramientas moleculares nativas en microorganismos ambientales aplicables a la manipulación genética de plantas, conforme se realicen más investigaciones. Este estudio representa el primer reporte sobre la estabilidad termodinámica y el acoplamiento molecular de elementos asociados al dúplex tracrARN-<sub>DR</sub>ARN en el fitosimbionte *A. palmae*.

**Palabras clave:** acoplamiento molecular, bioinformática, mycoplasma, transactivador.

## Abstract

The CRISPR-Cas9 technology used in plant biotechnology is based on the use of Cas9 endonucleases to generate precise cuts in the genome, and a duplex consisting of a trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA) and a CRISPR RNA (<sub>DR</sub>RNA) which are precursors of guide RNA (sgRNA) commercially redesigned (sgRNA-Cas9) to guide gene cleavage. Most of these tools come from clinical bacteria. However, there are several CRISPR-Cas9 systems in environmental microorganisms such as phytoendosymbionts of plants of the genus *Acholeplasma*. But the exploitation of these systems more compatible with plants requires using bioinformatics tools for prediction and study. We identified and characterized the

elements associated with the duplex in the genome of *A. palmae*. For this, the protein information was obtained from the Protein Data Bank and the genomics from GenBank/NCBI. The CRISPR system was studied with the CRISPRfinder software. Alignment algorithms and NUPACK software were used to identify the tracrRNA and  $_{DR}$ RNA modules, together with various computational software for genetic, structural and biophysical characterization. A CRISPR-Cas system was found in *A. palmae* with type II-C characteristics, as well as a thermodynamically very stable duplex, with flexible regions, exhibiting a docking power with Cas9 thermodynamically favored. These results are desirable in programmable gene editing systems and show the possibility of exploring native molecular tools in environmental microorganisms applicable to the genetic manipulation of plants, as more research is carried out. This study represents the first report on the thermodynamic stability and molecular docking of elements associated with the tracrRNA- $_{DR}$ RNA duplex in the phytosymbiont *A. palmae*.

**Keywords:** molecular docking, bioinformatics, mycoplasma, transactivator.

## Resumo

A tecnologia CRISPR-Cas9 usada em biotecnologia vegetal é baseada no uso de nucleases Cas9 para gerar cortes precisos no genoma e um duplex composto de um RNA CRISPR transativador (tracrRNA) e um RNA CRISPR ( $_{DR}$ ARN) que são precursores de o RNA guia comercialmente reprojetoado (sgRNA) (sgRNA-Cas9) para guiar a clivagem do gene. A maioria dessas ferramentas vem de bactérias clínicas. No entanto, existem vários sistemas CRISPR-Cas9 em microrganismos ambientais, como fitoendossimbiontes do gênero *Acholeplasma*. Mas a exploração desses sistemas mais compatíveis com as plantas requer o uso de ferramentas de bioinformática para sua previsão e estudo. Os elementos associados ao duplex tracrARN- $_{DR}$ ARN em *A. palmae* foram identificados e caracterizados. Para isso, as informações sobre proteínas foram obtidas no Protein Data Bank e a genômica no GenBank / NCBI. O sistema CRISPR foi estudado com o software CRISPRfinder. Algoritmos de alinhamento e o software NUPACK foram utilizados para identificar os módulos tracrRNA e  $_{DR}$ ARN, além de diversos softwares computacionais para caracterização genética, estrutural e biofísica. Um sistema CRISPR-Cas foi encontrado em *A. palmae* com características do tipo II-C, bem como um duplex com regiões flexíveis, termodinamicamente muito estável, apresentando uma energia de acoplamento termodinamicamente favorecida com Cas9. Esses resultados são desejáveis em sistemas de edição de genes programáveis e mostram a possibilidade de explorar ferramentas moleculares nativas em microrganismos ambientais aplicáveis à manipulação genética de plantas, à medida que mais pesquisas são realizadas. Este estudo representa o primeiro relatório sobre a estabilidade termodinâmica e acoplamento molecular de elementos associados ao duplex tracrRNA- $_{DR}$ ARN no fitossimbionte *A. palmae*.

**Palavras chave:** acoplamento molecular, bioinformática, micoplasma, transativador

## Introducción

*Acholeplasma* es un género de bacterias fitosimbiontes sin pared celular, clasificadas en la división Firmicutes, clase Mollicutes, orden Acholeplasmatales y familia Acholeplasmataceae. Hay 15 especies reconocidas en este género. Los genomas de las especies varían de 0,5 a 2,2 Mbp con un contenido de G+C es bajo, oscilando entre 20% y 40%. La temperatura óptima de crecimiento de estos organismos es de 30° a 37° C, son saprófitas y se encuentran en el suelo, el compost, las aguas residuales o como comensales de vertebrados, insectos o plantas, siendo consideradas como endosimbiontes de plantas (Ipoutcha *et al.*, 2019).

Hasta ahora no hay información sobre si alguna de las especies de *Acholeplasma* sea patógeno primario de plantas, pero se sabe que pueden causar efectos citopáticos en cultivos de tejidos (Windsor *et al.*, 2010; Kube *et al.*, 2014). Estas bacterias pueden aislarse de la superficie de plantas como el brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica* descriptor) o de tejidos de la corona de la palma de coco (*Cocos nucifera* descriptor) (Tully *et al.*, 1994).

*A. aidlawii* ha sido la especie más estudiada y la única del género aprovechada en estudios biotecnológicos (Windsor *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2018; Mirabelli *et al.*, 2019). Sin embargo, existen otras especies del género *Acholeplasma* cuyos genomas han sido completamente secuenciados como *A. palmae* J233 (cuyo genoma es de 1.554.229 bp), y esto ha permitido el

## Introduction

Plant's health and productivity have been linked to their microbiota dominated mainly by bacteria and fungi (Purahong *et al.*, 2018). Interactions between plants and microorganism have been present for a long time in evolution, since microorganisms have helped plants to deal with lack of nutrients, stressful conditions, and pathogens (Smith *et al.*, 2015). The study of plant-associated bacteria, their antagonistic potential in control of pathogens and their effect as growth promoters comprise the action of several genera and species of bacteria that can be isolated from the surface of plant tissues or obtained from within the plant (Daungfu *et al.*, 2019). In Mexico, and many other parts of the world, basil (*Ocimum basilicum* L., Fam. Lamiaceae) is an economically important aromatic herb. In Baja California Sur, Mexico, production of sweet basil was approximately 1,685 tons at the end of 2019 cycle (SIAP 2019). Nuffar variety was the main sweet basil grown in the state. This plant is used in the food industry and in traditional medicine (Gilardi *et al.*, 2013). Basil plants shelter a distinctive microbiota responsible for growth, quality and health via microbial metabolism and host interactions (Adamović *et al.*, 2015). However, successive cultivation in the same soil for a long time is known to be associated with changes in physicochemical properties of the ground, which in turn, provides conditions that cause diseases by pathogens, leading to

estudio comparativo entre las especies del género y las especies relacionadas (Tully *et al.*, 1994; Kube *et al.*, 2014). Es importante destacar que los análisis comparativos han revelado que *A. palmae* J233 es la única especie descrita de estos fitoendosimbiontes con un sistema genético tipo CRISPR-Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-associated systems or cas genes*) confirmado, pero aun no caracterizado (Bumgardner *et al.*, 2015). Estos sistemas genéticos son importantes porque pueden estar asociados a factores de patogenicidad y virulencia en microorganismos (Westra *et al.*, 2014). También son precursores de herramientas de manipulación genética usadas en biotecnología vegetal como estrategia hacia una agricultura sostenible (Belhaj *et al.*, 2015).

Específicamente, los sistemas CRISPR son un nuevo grupo de herramientas empleadas en biotecnología vegetal basada en el uso de endonucleasas de restricción de la familia *caspasas*, como la Cas9, que provienen del sistema de inmunidad natural procarionota CRISPR tipo II, y que incluye la nucleasa, la secuencia trans-activadora CRISPR RNA (*trans-activating CRISPR RNA* o *tracrRNA*), la secuencia CRISPR ARN (*CRISPR RNA* o *crRNA*) y el motivo adyacente al protoespaciador (*protospacer adjacent motifs* o *PAM*). El crARN, tracrARN y PAM conforman los elementos genéticos del complejo tracrARN-crARN, el cual es precursor del ARN de guía única (sgARN) (*simple guide RNAs*

devastating yield losses. In this study, the objective was to isolate and identify bacteria associated to healthy basil plants from crops around La Paz, Baja California Sur, Mexico, with the ability to inhibit pathogenic fungi development without affecting seedling development.

## Material and methods

### Plant material and experimental site

Samples of basil plants were taken from crops with similar agroecological conditions within the area of La Paz, B.C.S. México. Three adult basil plants, ready for harvest, apparently healthy, with intact aerial parts (normal leaves without spots or color alterations), stems without deformations, separated at least 50 meters one from each other, were randomly selected per crop. The crop locations were: Pescadero (Pradera Escolar 23°21'56"N, 110°10'27"W and Las Maravillas 23°21'43"N, 110°11'18"W), Todos Santos (Sueño Tropical 23°31'29"N, 110°17'15"W) and Los Planes (Cesar Cárdenas, 23°57'11"N, 109°55'50"W). Root, stem and leaves of each plant were separated and placed in sterile plastic bags. Later, the samples were transported to the Laboratory where the microbiological analysis was carried out.

### Isolation of bacteria

To isolate predominant bacteria, two culture media were used. Standard methods agar or plate count agar (SMA, DIFCO) was used to isolate bacteria and de Man Rogosa

o *sgRNA*), una molécula rediseñada comercialmente para establecer un complejo ribonucleoproteico (RNP) con el *sgARN* y la nucleasa (formado en complejo *sgARN-Cas9*) y dirigir de forma específica la escisión (o corte) programable de genes y genomas (Chyou y Brown, 2019). Por lo tanto, caracterizar los elementos *tracrARN* y *crARN* tienen un alto interés biotecnológico (Kaushik *et al.*, 2019). En este sentido esta investigación se centró en dicha caracterización. Especialmente porque se sabe que el uso de sistemas compatibles con el objeto de estudio como las “agrobacterias” para plantas, puede otorgar mejoras en los procesos de edición genética y fitomejoramiento de las células vegetales receptoras (Demirer *et al.*, 2019; Danilo *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020; Rodríguez *et al.*, 2021). El interés también radica en que existe una gran diversidad de herramientas para la manipulación genética de plantas, pero todas provienen de sistemas CRISPR tipo-II de bacterias de interés clínico como *Staphylococcus aureus* (SaCas9), *Streptococcus thermophilus* (StCas9), *Neisseria meningitidis* (NmCas9) y *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) (Zhang *et al.*, 2019).

Sin embargo, en la naturaleza existe una gran diversidad de sistemas CRISPR-Cas tipo II y de elementos claves para la edición genética como los complejos *tracrARN-crARN* en microorganismos ambientales menos estudiados como *A. palmae*, la única especie del género *Acholeplasma* con un sistema CRISPR conocido (Bumgardner *et al.*, 2015). Pero la

and Sharp agar (MRS, DIFCO) was used to isolate lactic acid bacteria. Briefly, 10 g of root, stem or leaves were placed into 90 mL of phosphate buffer saline (PBS) (145 mM NaCl, 2.87 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 6.95 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.2) and triturated with a tissue homogenizer (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel) until a suspension was obtained. Serial dilutions were prepared and then 100  $\mu\text{L}$  of each dilution was spread on duplicated Petri dishes containing: SMA and MRS, the plates were incubated at 35 °C for 24 h. Bacteria from predominant and morphologically different colonies were cross streaked and purified onto plates containing the same media as the plate they grew first. Bacteria were characterized by Gram staining and cell morphology under a phase contrast microscope (Nikon Eclipse E-600), then inoculated in Tryptic Soy Broth (TSB, DIFCO) and incubated overnight at the above temperature and preserved with 50 % glycerol at -80 °C (Goldman and Green 2009). The isolated bacteria were labeled as follows: first two letters correspond to the investigated plant, in this case AL for basil; third letter corresponds to culture media they were isolated from, A for standard methods agar and M for de Man Rogosa and Sharpe medium. Fourth letter corresponds to the part of the plant sampled: R for root, T for stem and H for leaves. First number corresponds to the sampling area: 1-3 corresponds to Pescadero, 4-6 corresponds to Los Planes and 7-9 corresponds to Todos Santos. Finally, the last number corresponds to the isolated colony.



explotación de estos sistemas capaces de establecer interacciones con plantas requiere usar herramientas bioinformáticas para su predicción y estudio.

Para evitar confusiones el término tracrARN-crARN el cual se usa para referirse típicamente al complejo entre las secuencias llamadas repeticiones directas (*Direct Repeat o DR*) tracrARN y crARN, fue sustituido en este trabajo por tracrARN-<sub>DR</sub>ARN, debido a que en un sentido estricto el crARN maduro se compone de la DR y de un elemento de ARN denominado “*espaciador*”, el cual no fue considerado en los análisis realizados, por ser el elemento genético altamente variable del dúplex tracrARN-crARN (Chyou y Brown, 2019). Por lo que se realizó la caracterización de los elementos genéticos que conforman el dúplex designado como tracrARN-<sub>DR</sub>ARN asociados al sistema CRISPR-Cas tipo II en el genoma de *A. palmae* con el interés de ofrecer bases teóricas alternativas que contribuyan con los procesos de manipulación genética aplicables a la biotecnología vegetal.

## Materiales y métodos

### Secuencia genómica, identificación y caracterización del sistema CRISPR-Cas

La información genómica de la especie *A. palmae* J233 (*GenBank accession* GCA\_000968055.1; *RefSeq accession* GCF\_000968055.1; *RefSeq sequence* NC\_022538.1) fue obtenida del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El CRISPR loci así como los genes Cas asociados se identificaron

### Model Fungi used in antagonistic assay

The fungi used in this study were *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp. and *Hendersonula* spp. currently identified as *Neoscytalidium dimidiatum*. *Aspergillus* spp. comes from a monosporic culture isolated from soil and characterized by its colonial (macroscopic) and cellular (microscopic) morphology according to general taxonomic keys in the Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos at this University. This fungus was used in this research as a model to carry out the first screening of bacteria with antagonistic capacity. *Alternaria* spp. and *N. dimidiatum* also come from a monosporic culture and were previously isolated from *Ocimum basilicum* L. and *Ficus benjamina* respectively (Hernández-Montiel *et al.*, 2018). These fungi were used as a model for important plant pathogens in this region.

### Qualitative antifungal assay

The antifungal activity was detected using a methodology developed by our research group. The confrontation assays against *Aspergillus* spp. were carried out in a method previously described (Joo *et al.*, 2015), modified with dual culture plates containing a mixture of TSA and PDA at 1:1 ratio. The isolated and purified bacteria were inoculated at 1 % in TSB and incubated overnight at 30 °C, then 10 µL drop of the suspension was placed on each Petri dish at 15 mm away from the edge. The dishes were incubated for 24 h at 30 °C. Subsequently, a 4 mm diameter filter paper disk, moistened with PBS

y caracterizaron con el servidor web CRISPRCasFinder (Couvin *et al.*, 2018) (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index>). Todos los espaciadores fueron comparados con la base de datos GenBank/NCBI (Benson *et al.*, 2018) para la búsqueda de secuencias homólogas con emparejamiento  $\geq 95\%$  usando BLAST (Shen *et al.*, 2017). Adicionalmente se predijo el número de posibles estructuras secundarias a partir de las secuencias de repeticiones directas (DR) y del tracrARN previas a la energía libre mínima de Gibbs para la formación ( $\Delta G$ ) usando barriers web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/barriers.cgi>).

### Predicción del tracrARN y crARN

Para buscar la porción anti-repetición del tracrARN, se realizó una alineación local de nucleótidos usando BLAST entre la secuencia DR consenso y las secuencias de ADN dentro de una de las siguientes cuatro regiones no codificantes: dentro de 500 nt aguas arriba de cas9 y entre cas9 y cas1, y en la matriz de espaciadores más DR, o dentro de 500 nt aguas abajo de la matriz espaciadores más DR. Se utilizaron los siguientes parámetros para el BLAST: algoritmo, secuencias algo similares (blastn); tamaño de palabra, 7; puntajes de coincidencia/desajuste, 1, -2; costos de brecha, existencia 1 y extensión 2. A partir de los resultados de la alineación, se identificaron las secuencias del “potencial de tracrARN”. Una vez localizada la región anti-repetición correspondiente al tracrARN, se

was impregnated with spores of an *Aspergillus* spp. colony grown for 72 h at 30 °C in PDA medium, and then placed 15 mm away from the bacteria colony. The dual cultures, performed in duplicate, were incubated for 72 h at 30 °C and then inhibition zones were observed. A Petri dish inoculated only with the disc containing the fungus was used as positive control.

### Confirmatory antifungal assay

The growth of bacteria that clearly showed an inhibition zone of *Aspergillus* spp. were tested against *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* and *Alternaria* spp. using methodology developed by our research group. Bacterial strains reactivated in TSB were inoculated at 1 % in tubes with the same medium and incubated for 24 h at 30 °C. Subsequently, they were centrifuged at 3,500 rpm, the supernatant was decanted, and the pellets were resuspended in the same volume of PBS. Parallely, the fungi were cultivated in PDA for 72 h, its spores were collected, and its concentration was adjusted to  $10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$  by direct count, under the microscope using a Neubauer plate. Then, 0.1 mL of the suspensions were spread onto TSA-PDA 1:1 Petri dishes. Later three 10  $\mu\text{L}$  drops of each bacterial suspension were evenly distributed on the plate previously spread with a fungus. The plates were then incubated at 30 °C for 72 h. After the incubation time, the zone of inhibition was measured in millimeters. Two replicates were made per treatment and the experiment was repeated twice. Inhibition zones were measured and bacteria with

extendió la búsqueda en la dirección 3' hasta que se encontró una secuencia con semejanza a un terminador de transcripción independiente de Rho. Si no hubiese un terminador transcripcional claro, se extendería la búsqueda de tracrARN en la dirección 5', buscando una estructura similar flanqueada por una cadena rica en A. Los promotores transcripcionales y los terminadores independientes de Rho también se predijo utilizando el programa BDGP Neural Network Promoter Prediction ([www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) y el software TransTermHP (<http://transterm.ccb.jhu.edu/query.php>), respectivamente (Chylinski *et al.*, 2013). Si el tracrARN está codificado en la dirección de 3' a 5', el complemento inverso de la secuencia se usó durante los análisis. Empleando el software de predicción de plegamiento de RNA NUPACK (<http://www.nupack.org/>) se predijo las estructuras secundarias del dúplex tracrARN y <sup>DR</sup>ARN, así como la  $\Delta G$ . Se utilizó un algoritmo de plegado que permite oscilaciones de base G-U. Para NUPACK, las secuencias de tracrARN y <sup>DR</sup>ARN se introdujeron en la dirección 5' a 3'. Usando las siguientes opciones: tipo de ácido nucleico, ARN; número de especies de hebras, 2; tamaño complejo máximo, 2; concentración de cadena1, 1  $\mu\text{M}$  y concentración de cadena2, 1  $\mu\text{M}$ . Se identificaron los elementos asociados a las estructuras secundarias (tallo superior, bulto, tallo inferior, nexos y horquillas) (Chylinski *et al.*, 2013; Briner *et al.*, 2016; Chyou y Brown, 2019).

large inhibition zones (more than 10 mm) were selected for molecular identification.

### Molecular identification

Bacteria were identified by 16S rDNA gene sequencing. Total DNA was extracted following manufacturers recommendation (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega Corporation). PCR was carried out using universal primers pA (forward): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and pH (reverse): 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' following Broda *et al.* (1999) method. The amplicons were purified and then sequenced. The obtained data was processed using BLAST searches in the NCBI and uploaded to GenBank database.

### Germination test

Microtubes were filled with one hundred twenty basil seeds. The seeds were disinfected with a 4.25 % aqueous sodium hypochlorite solution for 2 minutes, rinsed with sterile distilled water three times. Then seeds were inoculated with the suspension of bacteria that presented antifungal activity against *Aspergillus* spp. containing  $10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup> and let stand for two minutes. The supernatant was decanted, and the seeds were set in a completely random design which consisted of four replicates of 30 seeds per treatment and controls. The seeds were placed in Petri dishes with a filter paper covering the bottom of the plate. Water was added to moisten the seeds and then let stand for 5 days in the dark in a germination chamber at 25 °C. Testa rupture was considered as indication of germination. Five

### Análisis complementarios

Se determinó la longitud de las regiones del dúplex, así como el porcentaje GC, la temperatura de fusión ( $T_m$ ), masa molecular y regiones de máxima flexibilidad usando el software Unipro UGENE-v.1.32.0. Se calculó el tamaño (en términos del radio) del dúplex tracrARN-<sub>DR</sub>ARN con el método del cálculo del área de superficie accesible al solvente (SASA) usando el algoritmo Shrake-Rupley (Dupuis *et al.*, 2014). Se predijo la estabilidad termodinámica del dúplex en términos de  $\Delta G$  usando NUPACK, así como las estructuras secundarias a diversos intervalos de temperatura (12°, 15°, 23°, 30°, 37°, 40° y 42° C) (Høyland-Krogsho *et al.*, 2018). En todos los casos fue estimado el tamaño de las estructuras generadas. Adicionalmente, se calculó la energía de interacción entre las regiones del dúplex y la nucleasa asociada mediante acoplamiento molecular. Para ello la información proteica se obtuvo del Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). La estructura tridimensional de la nucleasa fue modelada con SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). El complejo tracrARN-<sub>DR</sub>ARN-Cas9 se preparó con el software HDOCK (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) y fue posteriormente analizado usando Molegro Molecular Virtual (MMV)-v.7.0.0. Se calcularon las funciones de puntuación HDOCK (Yan *et al.*, 2017) y MolDock Score (Thomsen y Christensen, 2006). Los acoplamientos moleculares se llevaron a cabo entre la Cas9 y cada una de las regiones que componen al dúplex tracrARN-<sub>DR</sub>ARN porque se sabe que

days old seedlings were separated out by hypocotyl and radicle, length of all seedlings was measured by the software RootNav (Pound *et al.*, 2013), then dried and weighted to obtain dry biomass. The significance of the obtained results was analyzed by one-way univariate analysis of variance (ANOVA), seed inoculation with different bacteria was used as a fixed factor. The difference between the means was determined by Tukey's test HSD multiple range test at  $p=0.05$ . Mean values were considered significantly different when  $p \leq 0.05$ . Statistical analysis was carried out using SAS software (Statistical Analysis System (SAS) software, SAS University Edition).

### Results and discussion

The microbiological status of healthy basil plants should be determined by the growing conditions, the environment of the region, the method of cultivation and the associated beneficial microbiota at any stage of their production process. In this study a total of 165 isolates were obtained from the predominant microbiota of different parts of the sampled apparently healthy basil plants from different sites. Ninety-four isolates were from SMA and 71 from MRS media used in the microbiological analysis, all of them were Gram positive, 152 with bacillary and 13 with coccoid morphology. Among the most common plant colonizing bacteria, we can find those of the *Bacillus* genus (Moffat, 2001). It is known

en la naturaleza la Cas9 interacciona tanto con el complejo (tracrARN-DR-ARN) como con cada uno de sus elementos de manera independiente (Jinek *et al.*, 2012).

## Resultados y discusión

### Organización del sistema CRISPR-Cas en *A. palmae*

El genoma de *A. palmae* J233 es de 1 554 229 bp. En él se encontró un sistema CRISPR completo compuesto por una matriz de DR más espaciadores entre la región 311 136 y 314 270 (Figura 1), con 48 DR de una longitud de 36 pb y una secuencia consenso de las DR conservada dentro de la matriz en un CGTAATTTTTGCTATCTAACAAC-3'. El sistema CRISPR encontrado es del tipo II-C al estar conformado por los genes *cas9*, *cas1* y *cas2* ubicados entre la región de 305 599 y 310 195 pb, y orientados en dirección aguas arribas. Es este sentido, la matriz CRISPR exhibe las características típicas de los arreglos tipo II descritos para estos sistemas de inmunidad procariotas. Específicamente presenta la arquitectura que agrupa organismos de importancia clínico-ambiental como *Neisseria meningitidis* y *Campylobacter jejuni* (Chylinski *et al.*, 2013; Chyou y Brown, 2019). Estos presentan sistemas CRISPR que se han asociado con funciones no convencionales como factores de virulencia, regulación genética, entre otras, incluyendo la patogenicidad hacia plantas (Westra *et al.*, 2014).

La matriz presentó 47 secuencias espaciadoras muy diversas, que fueron

that induced systemic resistance is triggered by beneficial members of the root microbiome in a wide range of plant hosts making them resistant against various pathogenic threats. This systemic enhancement has also been described for many plant growth-promoting bacteria of the *Bacillus* genus (Pieterse *et al.*, 2014). It is well known that bacteria of the *Bacillus* genus have the capability of producing a series of bioactive compounds with antimicrobial activity (Raaijmakers, 2010).

The qualitative confrontation assay of the 165 isolates against *Aspergillus* spp. resulted in 15 bacilli strains that inhibited the growth of the fungus at different degrees (figure 1). Antagonistic strains were isolated from aerial part of plants collected in the towns of Los Planes and Todos Santos. It is known that conditions on the plant leaves and stem (aerial part) are harsh for bacteria resulting in local microsites at which conditions are favorable for growth and/or survival (Jacobs *et al.*, 2005).

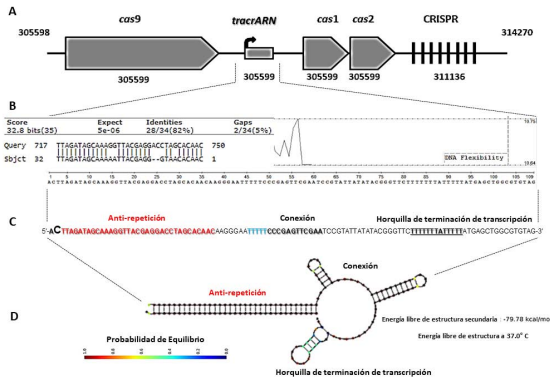
The confirmative confrontation assay against *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* and *Alternaria* spp., performed with the fifteen bacterial strains that showed antagonistic activity, confirmed the growth inhibition of fungi by some of them. Bacterial strains presented non regular inhibition zones on fungi growth; therefore, length and width measurements of the inhibition area were documented (table 1). This behavior was observed because some bacteria are highly mobile.

comparadas frente a una base de datos de 4200 secuencias plasmídicas y 2718 genomas completos de bacteriófagos según la información contenida en el GenBank/NCBI database. Se encontró que el 91,5% (43/47) de los espaciadores presentaron homología con secuencias asociadas a bacteriófagos, mientras que el 8,5% (4/47) presentó homología con plásmidos. El elevado número de espaciadores dirigidos a bacteriófagos, encontrados dentro de la matriz CRISPR, en más del 90% en *A. palmae*, imposibilita recomendar estrategias de control biológico para evitar los efectos citopáticos en cultivos de tejidos basadas en el uso de virus líticos infectivos (Fagoterapia) (São, 2018).

La predicción de la estructura secundaria de la DR consenso mostró una estructura termodinámicamente estable con un  $\Delta G$  de  $-2,90 \text{ kcal. mol}^{-1}$ . Además se predijo un total de otras 6439 posibles estructuras en un rango de energía de  $40 \text{ kcal. mol}^{-1}$  por encima de la  $\Delta G$ . Curiosamente, el  $\Delta G$  calculado a partir de las DR de la matriz CRISPR de *A. palmae* es termodinámicamente menos favorable que la gran mayoría de las DR consenso descritas al presentar un  $\Delta G$  con signo negativo de menor magnitud (Negahdaripour *et al.*, 2017; Shen, 2017; Zhao *et al.*, 2018; Baliga, 2018), pero sin dejar de ser una secuencia que media la transcripción de una estructura de ARN secundaria estable y de formación espontánea. Sin embargo, si bien los sistemas CRISPR tipo II han sido los más estudiados y aprovechados a nivel biotecnológico

Results of the molecular identification of bacteria with confirmed antifungal activity, showed that all of them belong to the *Bacillus* genus according to BLAST similarity analysis (table 2). *Bacillus* isolates like *B. subtilis*, *B. methylophilus* and *B. amyloliquefaciens* have been shown to have antagonistic activity against common plant pathogenic fungi. These bacteria species have been considered efficient colonizers that are widely spread due to their capacity to form spores, to grow in a wide range of temperatures and to produce antibiotic compounds that inhibit phytopathogens growth, besides being plant growth promoters (Rios-Velasco *et al.*, 2016).

In this investigation eight strains with antifungal activity against *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* and/or *Alternaria* spp., found in the samples obtained from basil plants, were identified and six of them belong to *B. amyloliquefaciens*. This is a microorganism that grows mainly in the rhizosphere, it begins to grow close to the formation point of lateral roots and it spreads on the root surface (Lugtenberg and Kamilova, 2005). Nowadays, it has been demonstrated that inoculation of crops with *B. amyloliquefaciens* strains could increase production under stressful conditions like nutrient limitations or high salinity levels (Kim *et al.*, 2017). It also has been observed that it could help to control other pathogens either by competing for nutrients or by producing antibiotics and lytic enzymes; particularly, the molecular basis of its plant growth-



**Figura 1.** Descripción de los elementos del sistema CRISPR-Cas9 Tipo II-C y del *tracrARN*-*DR* *ARN* asociado en *Acholeplasma palmae*. (A) Representación esquemática de los genes *cas* adyacentes a la matriz CRISPR. (B) Identificación de la porción anti-repetición del *tracrARN* que forma el tallo superior. La secuencia “query” (consulta, en español) es la región genómica aguas arriba entre el gen *cas9* y *cas1*. La secuencia “sbjct” (Sujeto) es la secuencia de repetición CRISPR consenso. La anti-repetición detectada por BLAST tenía una identidad del 82%. Se muestra además la región de máxima flexibilidad de la secuencia entre el nt 50 y 60 que coincide con el segmento “Conexión”. (C) Secuencia de bases nitrogenadas del *tracrARN* en el locus CRISPR. Anti-repetición (rojo) del dúplex *tracrARN*-*DR* *ARN*, nucleótidos no apareados que forman la protuberancia (negrita), módulo del tallo inferior (azul). Adyacente al tallo inferior se encuentra el módulo nexa que forma una horquilla en estructura secundaria de *ARN*. La secuencia “aC” previa al segmento anti-repetición corresponde con el promotor para la secuencia del dúplex. (D) La búsqueda prevista de *tracrARN* se extiende a través de un terminador transcripcional independiente de *Rho*, identificado en la figura como los nucleótidos en negrita subrayados, localizados al final de la secuencia de *tracrARN*. Se muestra también la  $\Delta G$  a 37°C.

**Figure 1.** Description of the elements of the CRISPR-Cas9 Type II-C system and the associated *tracrRNA*-*DR* *RNA* in *Acholeplasma palmae*. (A) Schematic representation of the *cas* genes adjacent to the CRISPR matrix. (B) Identification of the anti-repeat portion of the *tracrRNA* that forms the upper stem. The “query” sequence is the upstream genomic region between the *cas9* and *cas1* gene. The sequence “sbjct” (Subject) is the consensus CRISPR repeat sequence. The anti-repeat detected by BLAST had 82% identity. The region of maximum flexibility of the sequence between nt 50 and 60 that coincides with the “Connection” segment is also shown. (C) Sequence of nitrogenous bases of *tracrRNA* at the CRISPR locus. Anti-repeat (red) of the *tracrRNA*-*DR* *RNA* duplex, unpaired nucleotides forming the bulge (bold), lower stem module (blue). Adjacent to the lower stem is the nexus module that forms a hairpin in *RNA* secondary structure. The “aC” sequence prior to the anti-repeat segment corresponds to the promoter for the duplex sequence. (D) The predicted search for *tracrRNA* extends through a *Rho*-independent transcriptional terminator, identified in the figure as the underlined bold nucleotides, located at the end of the *tracrRNA* sequence.  $\Delta G$  at 37°C is also shown.

gracias a sus enzimas asociadas de tipo nucleasas (Campenhout *et al.*, 2019; Kaushik *et al.*, 2019), no hay reportes sobre análisis comparativos *in silico* de la  $\Delta G$  de las DR en sus matrices CRISPR. Los análisis termodinámicos existentes se han centrado en sistemas tipo I-B (Negahdaripour *et al.*, 2017), I-C (Zhao *et al.*, 2018), I-E (Shen, 2017), I-F (Baliga, 2018) y III-B (Negahdaripour *et al.*, 2017), y aunque en la mayoría se predicen valores de  $\Delta G \geq -3,60 \text{ kcal.mol}^{-1}$  hay reportes de  $\Delta G$  entre  $-0,1$  y  $-2,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$  en estos sistemas (Negahdaripour *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018;), al igual que lo predicho en este estudio. Se encontró que pueden existir cerca del doble de estructuras de mínima energía a partir de la secuencia tracrARN que las calculadas a partir de las DR, esto posiblemente se deba a la mayor complejidad estructural y mayor número de interacciones nucleotídicas de los tracrARN. Es importante señalar que el número de posibles estructuras, así como su rol no ha sido aún estudiado a profundidad en los sistemas CRISPR.

### **Predicción y caracterización de las secuencias tracrARN y DRARN**

La porción de la región denominada anti-repetidos del tracrARN, fue localizada dentro de 500 nt aguas arriba de Cas9, entre *cas9* y *cas1* (Figura 1). Se pudo identificar una región de terminación Rho-independiente en sentido 3' a 5' rica en GC seguida de una región rica en T. En relación con la ubicación del tracrARN en *A. palmarum* a partir de la

promoting activity is mainly based on the production of secondary metabolites suppressing competitive microbial pathogens occurring in the plant rhizosphere, secretion of the plant growth hormone auxin and the synthesis of volatiles stimulating plant growth and induced systemic resistance (Chen *et al.*, 2009). In addition, some *B. amyloliquifaciens* strains could decrease the incidence of nematodes in some cultivars (Liu *et al.*, 2013). Other species found with antagonistic activity against fungi were *B. velezensis* and *B. subtilis*, members of the *Bacillus* genus as well and closely related to *B. amyloliquifaciens* (Rabbee *et al.*, 2019). Also, it has been shown that microbial colonization has an important impact on sweet basil quality, especially on accumulation of important secondary metabolites like essential oil (Banchio *et al.*, 2009). This outstanding ability is of great importance when production of high-quality products is of interest.

Strains with observed antagonistic effect against *Aspergillus* spp. were used in a germination experiment to determine the effect of the bacteria on total germination, length, and biomass production of basil seedlings. The total seed germination reached between 80 and 90 %. Figure 2 shows that all tested bacteria had no significant difference on total germination of basil seeds as compared to the control. Other reports regarding *Capsicum annuum* seed treatment with *B. amyloliquifaciens* resulted in maximum enhancement of seed germination (84.75 %), seedling vigor (1,423.8) along with an increase in vegetative growth parameters



DR consenso para localizar la región anti-repeticiones y usarla como guía según lo recomendado (Briner *et al.*, 2016) se encontró que la región anti-repeticiones presenta una alta complementariedad con la repetición pre-<sub>DR</sub>ARN y que está ubicada entre el gen *cas9* (módulo efector) y los genes *cas1-2* (módulo de adaptación) un arreglo de genes que solo se ha descrito en aproximadamente el 1% de los sistemas CRISPR tipo II-C examinados (Chylinski *et al.*, 2013; Chyou y Brown, 2019), entre los que se encuentra la bacteria Gram negativa degradadora de la mucina intestinal humana *Akkermansia muciniphila* ATCC BAA-835 (De Vos, 2017).

Sin embargo, se observó discrepancia en esta clasificación debido a que la ubicación del tracrARN observada en *A. palmae* ha sido definida también en los sistemas tipo II-A (Faure *et al.*, 2019; Ipoutcha *et al.*, 2019). Resultados que corresponden con otros autores donde se señala que la familia de tracrARN es una familia de ARN atípica sin una conservación obvia de la estructura, secuencia o localización dentro de los loci CRISPR-Cas tipo II (Chylinski *et al.*, 2013; Chyou y Brown, 2019; Faure *et al.*, 2019). Mostrando incluso genes Cas9 alterados (Ipoutcha *et al.*, 2019). Esta divergencia en la clasificación del subtipo de CRISPR en el genoma de *A. palmae* considerado quizás se deba a la propia diversidad de estos sistemas biológicos aún en estudio, debido a que la subcategorización de los CRISPR está dada por los arreglos de genes, y no por otros elementos asociados como los transactivadores (Makarova *et al.*, 2011; Van der Oost, 2014). De hecho,

(Gowtham *et al.*, 2018). Recently, a culture-independent next-generation sequencing-based approach was applied to investigate the beneficial impact of *B. amyloliquefaciens* L-S60 on the composition and dynamics of rhizosphere microbiota, and growth conditions of cucumbers during plug seedling. Application of L-S60 significantly altered the structure of the bacterial community associated with the cucumber seedling. Presence of beneficial rhizosphere species such as *Bacillus*, *Rhodanobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Nonomuraea*, and *Agrobacterium* was higher upon L-S60 treatment than in the control group (Qin *et al.*, 2017).

Likewise, hypocotyl (figure 3A) and radicle (figure 3B), dry biomass accumulation did not show any statistically significant difference among groups upon inoculation with isolated antagonistic strains. It is important to highlight that seedlings were analyzed at early stages of growth; in future experiments, the impact of these strains on morphometric characteristic of later stages of development will be carried out. Although, there were no statistically significant differences between treatments, a tendency to increase the dry weight can be observed in the hypocotyl with ALAT81 and ALMT74 and in radicle with ALMH71 and ALMT74.

In terms of radicle length, ALAH51, ALMR73, ALMT52, ALAT64, ALMH71, ALMH42, ALAH91 and ALMH92 were statistically equivalent as compared to the control. These observations indicate that

en el primer sistema CRISPR/Cas reportado en *A. palmarum* como de tipo II-A, se identificó un gen *csn2* (Ipoutcha *et al.*, 2019), un gen que, aunque se considera una firma específica de subtipo (Ka *et al.*, 2018), curiosamente no fue identificado en este estudio bajo las condiciones planteadas y con las herramientas computacionales propuestas.

Además, se ha reportado una mayor relación filogenética entre el sistema II-A descrito en *A. palmarum* con los II-C, que con los II-B (Ipoutcha *et al.*, 2019). Por lo tanto, es probable que el sistema predicho en *A. palmarum* represente una posible variante del sistema CRISPR subtipo II-C con la misma ubicación del *tracrARN* mostrada por los subtipos II-A. Al mismo tiempo que se pudo identificar la secuencia terminadora Rho-independiente rica en Ts como se ha reportado en estudios anteriores (Briner *et al.*, 2014).

Debido a las limitaciones de los algoritmos de predicción *in silico* de los promotores y los terminadores transcripcionales, se sugiere considerar las predicciones del promotor y del terminador transcripcional solo como un paso de apoyo y como parte de la caracterización de dúplex, pero no esencial, para la identificación de los *tracrARN*, como se ha recomendado (Chylinski *et al.*, 2013).

Luego del análisis de las regiones *tracrARN* y *DR* *ARN* usando BLAST, se encontró que no existe homología con ninguna región genómica de las especies presentes en el GenBank/NCBI database. La longitud de la región *tracrARN* es de 107 nt, su contenido de GC es de 39,25%.

the interaction of the mentioned bacteria strains above did not affect radicle growth during early seedling development. However, the rest of the isolated strains tested had negative effects, some of them at higher extend like ALMT73 and ALAT81. On the other hand, hypocotyl length did not show statistically significant difference of any of the treatments as compared to the control (table 4).

Further experimentations will be carried out to find out if these *Bacillus* species strains show antagonistic activities against other important phytopathogens if they have an impact on basil growth and quality in terms of essential oil and other desirable traits. Moreover, these strains could be used for inoculation of other plants to investigate their biotechnological potential.

## Conclusion

To our knowledge this is the first time that *B. amyloliquefaciens* strains have been isolated from basil cultivars. The biotechnological use of these bacteria to protect basil plants against fungi is a sustainable and reliable option to reduce crop loss due to fungi incidence. Furthermore, these bacteria are remarkable allies for basil plant development due to their ability to colonize them without damage. The investigation carried out and presented here in establishes the basis for further studies on agronomic useful these *Bacillus* strains that are naturally occurring in basil plants around La Paz, Baja California Sur, Mexico, where we can find very

Presenta una masa molar de 33 250,59 Da y un Tm de 74,71 °C, con una región de máxima flexibilidad entre los nucleótidos 50 y 60.

La región <sup>DR</sup>ARN presenta una longitud de 34 nt con un contenido de GC de 44,12%. Su masa molecular es de 10 530,77 Da y su Tm es de 63,21 °C, sin regiones flexibles predecibles. El alto contenido de pirimidinas en la región crARN y de purinas en la tracrARN calculado en *A. palmae*, y que impacta claramente en sus temperaturas de fusión, corresponden con lo reportado en la literatura (Briner *et al.*, 2016; Chyou y Brown, 2019). El <sup>DR</sup>ARN estudiado cuenta con una estabilidad medianamente conservada entre la región anti-repeticiones con la repetición pre-<sup>DR</sup>ARN como se ha descrito (Briner *et al.*, 2016; Chyou y Brown, 2019). Observaciones que muestran que la versatilidad y ventaja del uso de estas moléculas está estrechamente relacionada con la flexibilidad y estabilidad termodinámica de los complejos RNP establecidos, lo cual puede ser clave en la especificidad de corte como se ha señalado en la edición programable de genes (Kaushik *et al.*, 2019).

Los análisis de la secuencia genética mostraron que la región comprendida entre el segmento denominado nexus y la secuencia de terminación es la región con máxima flexibilidad estructural, lo que coincide con la secuencia localizada entre las conformaciones tallo-bucle típicas del módulo de terminación del dúplex (Briner *et al.*, 2014; Briner

distinctive environmental conditions like extreme temperatures, high soil salinity and drought.

## Acknowledgments

This work was supported by the Department of Agronomy at the Universidad Autónoma de Baja California Sur. Authors are thankful to Yozitlali Villavicencio-Velázquez and José Enrique Amador-Sánchez for technical support.

### *End of English Version*

*et al.*, 2016). La elasticidad en dicha región del tracrARN hace que el dúplex sea susceptible a cambios conformacionales, sin embargo, gracias a la carencia de regiones de menos rígidas detectables en el módulo <sup>DR</sup>ARN la estructura final resultante es termodinámicamente estable, sin cambios importantes en términos del tamaño expresado en radio de los dúplex. Aspecto importante para el aprovechamiento de este tipo de moléculas como precursores de sgARNs, gracias a que dicha plasticidad y estabilidad ha permitido, alternativamente al uso de los sistemas naturales Cas9-tracrARN-<sup>DR</sup>ARN, generar un ARN quimérico que imita el dúplex tracrARN-<sup>DR</sup>ARN para un sistema de dos componentes que combina la flexibilidad del ARN de interferencia (iARN) con la eficiencia de las enzimas de restricción (Briner *et al.*, 2014).

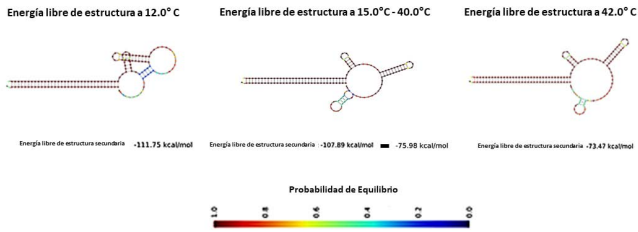
La predicción de la estructura secundaria del dúplex tracrARN-

$\text{DR-ARN}$  mostró una estructura termodinámicamente muy estable en términos de  $\Delta G$  de  $-79.78 \text{ kcal. mol}^{-1}$  a  $37^\circ \text{ C}$  (Figura 2), con un radio  $\approx 0,334 \text{ nm}$ . Adicionalmente, al examinar teóricamente tanto la  $\Delta G$  como el tamaño del dúplex a distintos intervalos de temperatura se encontró que el dúplex presenta una conformación termodinámicamente estable en todas las temperaturas probadas, sin cambios importantes en un rango aproximado de  $29^\circ \text{ C}$ , específicamente entre  $13^\circ \text{ C}$  y  $41^\circ \text{ C}$ . Solo se predijo cambios conformacionales en relación a su radio a temperaturas  $\leq 12^\circ \text{ C}$  y  $a \geq 42^\circ \text{ C}$ , con radios de  $0,380 \text{ nm}$  y  $0,323 \text{ nm}$ , respectivamente. Aunque se observó un aumento en el tamaño teórico del dúplex a bajas temperaturas, y una disminución a altas temperaturas, la diferencia del tamaño en el valor absoluto entre las conformaciones sometidas a los valores extremos de temperatura probadas fue de apenas  $\approx 0,057 \text{ nm}$ , este aspecto promueve la estabilidad conformacional. Curiosamente, aunque se ha descrito que otros sistemas CRISPR se ven afectados y modulados de manera importante por variaciones en la temperatura (Høyland-Krogsho *et al.*, 2018), en esta investigación el complejo genético estudiado muestra una estabilidad, conformación y termodinámica poco variable en función de la temperatura. Posiblemente esto se deba a que estos sistemas son dependientes del correcto funcionamiento de ambos módulos  $\text{tracrARN-DR-ARN}$  (Makarova *et al.*, 2011), lo que justificaría que el dúplex forme parte de un mecanismo

medianamente conservado, como se ha descrito para otras estructuras CRISPR (Kunin *et al.*, 2007).

En la Figura 2 se muestra la estabilidad conformacional en relación al  $\Delta G$  del dúplex, el cual se muestra con un tamaño aproximado en términos de radio de  $0,334 \text{ nm}$ . Adicionalmente, se evidencia una conformación termodinámicamente estable en la mayoría de las temperaturas probadas, sin cambios importantes en un rango entre  $13^\circ \text{ C}$  y  $41^\circ \text{ C}$ . Solo se predijo cambios conformacionales en relación a su volumen a temperaturas  $\leq 12^\circ \text{ C}$  y  $a \geq 42^\circ \text{ C}$ , con tamaños calculados de  $0,380 \text{ nm}$  y  $0,323 \text{ nm}$ , respectivamente. Todas las estructuras predichas resultaron conformaciones termodinámicamente favorables.

En relación con la  $\Delta G$ , la media termodinámica entre  $37^\circ$  y  $23^\circ \text{ C}$  fue de  $\approx 9 \text{ kcal. mol}^{-1}$ . Mientras que a las temperaturas extremas de este estudio fue  $\leq 4 \text{ kcal. mol}^{-1}$ . Es importante destacar que la diferencia termodinámica en términos de valor absoluto entre los valores extremos de temperatura probados fue de  $\approx 38 \text{ kcal. mol}^{-1}$ . Se predijo además un total de otras  $10.193.838$  posibles estructuras de mínima energía y por lo tanto factibles en su formación a partir de la secuencia  $\text{tracrARN}$  en un rango de energía de  $15,3 \text{ kcal. mol}^{-1}$  por encima de la  $\Delta G$ . Por otro lado, las energías de acoplamiento entre la Cas9 y las regiones del dúplex fueron muy cercanas y termodinámicamente favorecidas según la función de puntuación HDOCK, siendo estas de  $-217,14 \text{ kcal. mol}^{-1}$  para la región  $\text{DR-ARN}$ , y  $-200,66 \text{ kcal. mol}^{-1}$  para la región  $\text{tracrARN}$ .



**Figura 2. Cambios conformacionales y termodinámicos del dúplex tracrARN<sub>DR</sub>-ARN en *A. palmarum* a los intervalos extremos de temperatura probados.**

**Figure 2. Conformational and thermodynamic changes of the tracrRNA<sub>DR</sub>-RNA duplex in *A. palmarum* at the extreme temperature ranges tested.**

Curiosamente, la función de puntuación MolDock Score solo predijo un acoplamiento termodinámicamente favorecido entre la nucleasa y la región <sub>DR</sub>ARN (-409,367 kcal.mol<sup>-1</sup>) contrario a lo calculado entre la región tracrARN y Cas9 (25 449,706 kcal.mol<sup>-1</sup>) con una interacción no favorable (Figura 3). La función de puntuación MolDock Score mostró discrepancias y solo predijo un acoplamiento favorecido entre la nucleasa y la región <sub>DR</sub>ARN, calculando una interacción no favorable con la región tracrARN. Esto puede deberse quizás a limitaciones en el algoritmo MolDock como el requerimiento de la preparación de los complejos en el software Molegro Virtual Docker (MVD-v.7.0.0) antes del análisis con el MMV (Thomsen y Christensen, 2006; Azeez *et al.*, 2012) y en este

estudio el complejo fue preparado y ensamblado en el software HDock por la naturaleza del ligando (Yan *et al.*, 2017), o posiblemente por el gran tamaño de la secuencia tracrARN utilizada. Sin embargo, en todos los casos las interacciones observadas están representadas por múltiples puentes de hidrogeno, interacciones electrostáticas y estéricas, las cuales facilitan un acoplamiento termodinámicamente favorecido entre los módulos del trans-activador y la nucleasa, especialmente con la región <sub>DR</sub>ARN, y que en conjunto conforman una estructura que permite un estable ensamblaje del complejo RNP, promoviendo un eficiente reconocimiento de las secuencias dianas y el consecuente clivaje (Lau y Davie, 2017).

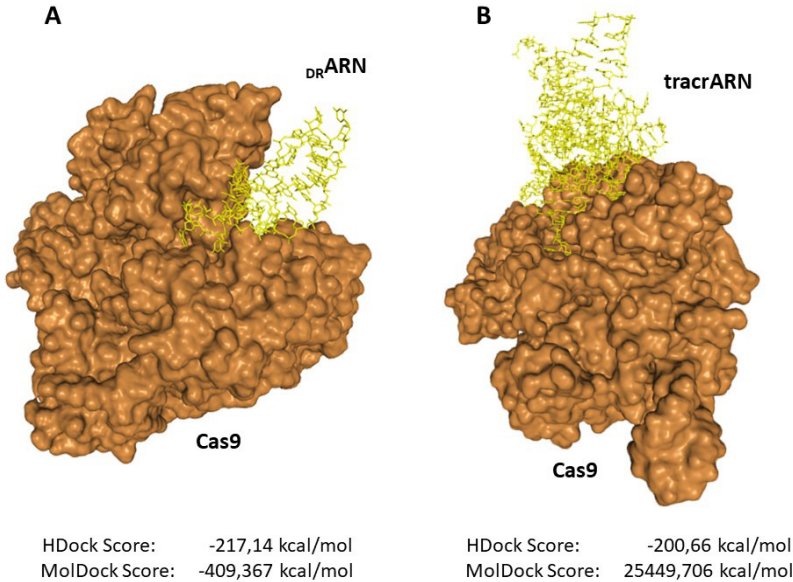
En la Figura 3 se muestran las energías de acoplamiento entre la Cas9 y las regiones del dúplex las cuales fueron muy cercanas y termodinámicamente favorecidas según la función de puntuación HDOCK. Las energías fueron  $-217,14 \text{ kcal.mol}^{-1}$  para la región  $_{DR}ARN$ , y  $-200,66 \text{ kcal.mol}^{-1}$  para la región  $tracrARN$ . La función de puntuación MolDock Score solo predijo un acoplamiento termodinámicamente favorecido entre la nucleasa y la región  $_{DR}ARN$  ( $-409,367 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) contrario a lo calculado entre la región  $tracrARN$  y Cas9 ( $25449,706 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) con una interacción no favorable, sin embargo, en todos los casos el software MMV predijo interacciones representadas por puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas y estéricas. Es importante señalar que si bien, este trabajo se centró en la caracterización del dúplex  $tracrARN$ - $_{DR}ARN$ , incluyendo su energía de interacción con la nucleasa Cas9. Esto fue predicho a partir de la secuencia reportada en el GenBank/NCBI y según los modelos tridimensionales presentes en el *Protein Data Bank*. Estos modelos fueron utilizados como plantilla por SWISS-MODEL y luego refinados con HDOCK, al no existir para el momento de realizado este estudio una cristalografía de la endonucleasa Cas9 asociada a CRISPR en *A. palmae*. El modelo utilizado estuvo representado por una estructura con una cobertura del 90 %, pero con una identidad de solo el 40 % con la estructura cristalina de la Cas9 de *Staphylococcus aureus*. Un resultado

que muestra una gran diversidad proteica y la poca similitud a nivel de esta nucleasa entre *A. palmae* y el resto de los grupos microbianos relacionados en términos de sistemas CRISPR. Lo cual puede contribuir con la predicción de afinidades diferentes y, por ende, con resultados contradictorios. Por lo tanto, se recomienda realizar un número mayor de predicciones de energía relativa de unión considerando otros tipos de Cas9, especialmente porque existe una gran diversidad de estas moléculas (Bae *et al.*, 2014), así como reportes de variantes alteradas estrechamente relacionadas (Ipoutcha *et al.*, 2019), con la finalidad de validar la metodología empleada.

Adicionalmente, se sugiere modelar diversas conformaciones de la secuencia  $tracrARN$ - $_{DR}ARN$ , así como realizar acoplamientos macromoleculares del dúplex completo con las nucleasas consideradas porque nuestro enfoque se centró en estudiar la afinidad de la nucleasa sobre los elementos individuales del dúplex porque se sabe que la Cas9 interactúa fuertemente con la región  $tracrARN$  al mismo tiempo que participa en la maduración de la región  $_{DR}ARN$  (Jinek *et al.*, 2012).

## Conclusión

El uso de herramientas bioinformáticas permiten la predicción y estudio de sistemas CRISPR-Cas tipo II y de sus elementos claves para la edición genética en el fitoendosimbionte *A.*



**Figura 3. Acoplamiento macromolecular de las regiones del dúplex tracrARN-<sub>DR</sub>ARN con la Cas9 en *A. palmae*.**

**Figure 3. Macromolecular docking of the regions of the tracrRNA-<sub>DR</sub> RNA duplex with Cas9 in *A. palmae*.**

*palmae*. Estas estrategias ofrecen alternativas teóricas diversas para los sistemas CRISPR comerciales aplicables a la biotecnología vegetal. Se requieren más estudios, así como demostraciones experimentales en modelos celulares. Este estudio representa el primer reporte sobre la estabilidad termodinámica y el acoplamiento molecular de elementos asociados al dúplex tracrARN-<sub>DR</sub>ARN en la especie fitosimbionte *A. palmae*.

potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*, 30(10),1473-1475.

Baliga, P., M. Shekar and M. Nagarajappa. 2018. Investigation of direct repeats, spacers and proteins associated with clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) system of *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol Genet Genom*, 294(1),253–262.

Belhaj, K., A. Chaparro-Garcia, S. Kamoun, N. Patron and V. Nekrasov. 2015. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 32(1),76–84.

Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, K. D., and Sayers, E. W. 2018. GenBank. *Nucleic Acids Res.*, 46(D1),D41-D47.

**Cited literature**

Bae, S., Park, J., and Kim, J. S. 2014. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for

- Bumgardner, E., W. Kittichotirat, R. Bumgarner and P. Lawrence. 2015. Comparative genomic analysis of seven *Mycoplasma hyosynoviae* strains. *Microbiologyopen*, 4(2),343-359.
- Briner, A, P. Donohoue, A. Gomaa, K. Selle, E. Slorach, C. Nye and R. Barrangou. 2014. Guide RNA functional modules direct Cas9 activity and orthogonality. *Mol. Cell*, 56(2),333-339.
- Briner, A., E. Henriksen and R. Barrangou. 2016. Prediction and validation of native and engineered Cas9 guide sequences. *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2016(7),pdb-prot086785.
- Chylinski, K., A. Le Rhun and E. Charpentier. 2013. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA Biology*, 10(5),726-737.
- Chyou, T. and C. Brown. 2019. Prediction and diversity of tracrRNAs from type II CRISPR-Cas systems. *RNA Biology*, 16(4),423-434.
- Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., Rocha, E., Vergnaud, G., Gautheret, D. and Pourcel, C. 2018. CRISPRCasFinder, an update of CRISPRfinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res.*, 46(W1),W246-W251.
- De Vos, W. 2017. Microbe Profile: *Akkermansia muciniphila*: a conserved intestinal symbiont that acts as the gatekeeper of our mucosa. *Microbiology*, 165(5),646-648.
- Dupuis, N., E. Holmstrom and D. Nesbitt, D. 2014. Molecular-crowding effects on single-molecule RNA folding/unfolding thermodynamics and kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111(23),8464-8469.
- Høyland-Krogsho, N., K. Muñoz and B. Bassler, B. 2018. Temperature, by controlling growth rate, regulates CRISPR-Cas activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 9(6),e02184-18.
- Ipoutcha, T., Tsarmopoulos, I., Talenton, V., Gaspin, C., Moisan, A., Walker, C. A., Brownlie, J., Blanchard, A., Thebault, P. and Sirand-Pugnet, P. 2019. Multiple origins and specific evolution of CRISPR/Cas9 systems in minimal bacteria (*Mollicutes*). *Front. Microbiol.*, 10(2701),1-14.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096),816-821.
- Ka, D., Jang, D. M., Han, B. W., Bae, E. 2018. Molecular organization of the type II-A CRISPR adaptation module and its interaction with Cas9 via Csn2. *Nucleic Acids Res.*, 46(18),9805-9815.
- Kaushik, I., S. Ramachandran and S. Srivastava. 2019. CRISPR-Cas9: A multifaceted therapeutic strategy for cancer treatment. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 96(1),4-12.
- Kunin, V., R. Sorek and P. Hugenholtz. 2007. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol.*, 8(4),R61.
- Kube, M., C. Siewert, A. Migdoll, B. Duduk, S. Holz, R. Rabus and R. Reinhardt. 2014. Analysis of the Complete Genomes of *Acholeplasma brassicae*, *A. palmae* and *A. laidlawii* and their comparison to the obligate parasites from '*Candidatus Phytoplasma*'. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 24(1),19-36.
- Lau, V. and J. Davie. 2017. The discovery and development of the CRISPR system in applications in genome manipulation. *Biochem. Cell Biol.*, 95(2),203-210.
- Makarova, K., D. Haft, R. Barrangou, S. Brouns, E. Charpentier, P. Horvath and J. Van Der Oost. 2011. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.*, 9(6),467-477.
- Mirabelli, P., L. Coppola and M. Salvatore. 2019. Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. *Cancer*, 11(8),1098-1116.








- Negahdaripour, M., N. Nezafat, N. Hajjighahramani, S. Rahmatabadi and Y. Ghasemi. 2017. Investigating CRISPR-Cas systems in *Clostridium botulinum* via bioinformatics tools. *Infection, Genet. Evol.*, 54(2),355-373.
- Rodrigues, S. D., Karimi, M., Impens, L., Van Lerberge, E., Coussens, G., Aesaert, S., Rombaut, D., Holtappels, D., Ibrahim, H., Van Montagu, M., Wagemans, J., Jacobs, T., De Coninck, B. and Pauwels, L. 2021. Efficient CRISPR-mediated base editing in *Agrobacterium* spp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 118(2),e2013338118.
- São, C. 2018. Engineering of phage-derived lytic enzymes: Improving their potential as antimicrobials. *Antibiotics*, 7(2),29-32.
- Shen, J., D. Zhao, R. Sasik, and J. Luebeck. 2017. Combinatorial CRISPR-Cas9 screens for *de novo* mapping of genetic interactions. *Nat. Methods*, 14(6),573-578.
- Tully, J., R. Whitcomb, D. Rose, J. Bove, P. Carle, N. Somerson and S. Eden-Green. 1994. *Acholeplasma brassicae* sp. nov. and *Acholeplasma palmae* sp. nov., two non-sterol-requiring mollicutes from plant surfaces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 44(4),680-684.
- Thomsen, R. and M. Christensen. 2006. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *J. Med. Chem.*, 49(11),3315-3321.
- Westra, E., A. Buckling and P. Fineran. 2014. CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nat. Rev. Microbiol.*, 12(5),317-326.
- Yan, Y., D. Zhang, P. Zhou, B. Li, and S. Huang. 2017. HDock: a web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic Acids Res.*, 45(1),365-373.
- Zhao, X., Z. Yu and Z. Xu. 2018. Study the features of 57 confirmed CRISPR loci in 38 strains of *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.*, 9(1591),1-20.
- Zhang, Y., A. Malzahn, S. Sretenovic and Y. Qi. 2019. The emerging and uncultivated potential of CRISPR technology in plant science. *Nat. Plants*, 5(1),778-794.

## Efecto del estrés anisomótico sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides ovinos

Effect of anisotonic stress on the structural and functional integrity of the plasma and acrosomal membrane of ram sperm

Efeito da tensão anisomótica na integridade estrutural e funcional do plasma e da membrana acrossômica dos espermatozóides de ovinos

Jorge Rubio-Guillén<sup>1\*</sup>, Carla Osorio-Meléndez<sup>1</sup>, Decio González-Villalobos<sup>1</sup>, Héctor Nava-Trujillo<sup>2</sup> y Armando Quintero-Moreno<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Andrología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia (LUZ). Apdo. 15252. 4005-A. Maracaibo, Venezuela. Correo electrónico: (JR) [jorgeluis.rubio@gmail.com](mailto:jorgeluis.rubio@gmail.com), ; (CO) [carlaosorio85@gmail.com](mailto:carlaosorio85@gmail.com), ; (DG) [decio.gonzalez@gmail.com](mailto:decio.gonzalez@gmail.com), ; (AQ) [armando.quintero@fcv.luz.edu.ve](mailto:armando.quintero@fcv.luz.edu.ve), . <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela. [hectornava00@gmail.com](mailto:hectornava00@gmail.com), .

### Resumen

La integridad de la membrana plasmática (MP) y del acrosoma (MA) han sido dos de los parámetros de valoración seminal más estudiados por su rol preponderante como límite celular y por ser responsable de hacer efectivas las interacciones entre células. Con miras a valorar más objetivamente los efectos del estrés osmótico sobre la integridad de la MP y MA, así como la relación de cambio ocurrido durante la criopreservación seminal, se evaluaron cinco eyaculados recién colectados, refrigerados a 5 °C y descongeladas por morueco/sesión durante 5 semanas consecutivas. Mediante la tinción eosina-nigrosina (EN) se evaluó la vitalidad (VIT), las morfo anomalías y la respuesta celular luego de realizar las pruebas de resistencia osmótica (ORT), y de endósmosis (HOST). El efecto directo de la anisomosis y la criopreservación sobre las variables dependientes fueron analizados mediante el procedimiento GLM (SAS<sup>®</sup>) y cuando se observaron

Recibido: 26-09-2020 • Aceptado: 23-03-2021.

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [jorgeluis.rubio@gmail.com](mailto:jorgeluis.rubio@gmail.com)

diferencias, se cuantificaron los efectos mediante el LSMEANS. Todos los valores de calidad espermática estudiados fueron afectados significativamente ( $P < 0,001$ ) por la criopreservación (VIT, ORT, HOST). El ORT demostró como el acrosoma fue una de las estructuras más afectadas por la criopreservación ( $P < 0,001$ ). En conclusión, el presente estudio confirma que el estrés anisomótico afecta la célula espermática de manera importante, comprometiendo los valores referenciales que cuantifican la calidad seminal, sobretodo la MA y MP.

**Palabras clave:** estrés osmótico, semen, calidad espermática, ovinos.

### Abstract

The integrity of the plasma membrane (MP) and the acrosome (MA) have been two of the most studied seminal evaluation parameters due to their role as a cell boundary and because they are responsible for interactions between cells effective. To assessing more objectively the effects of osmotic stress on the integrity of the PM and MA, as well as the rate of change that occurred during seminal cryopreservation, five freshly collected ejaculates were evaluated, refrigerated at 5 °C and thawed per ram/session during 5 consecutive weeks. Using eosin-nigrosin (EN) staining, vitality (VIT), morpho abnormalities and cellular response were evaluated after performing osmotic resistance (ORT) and endosmosis (HOST) tests. The direct effect of anysosmosis and cryopreservation on the dependent variables were analyzed using the GLM procedure (SAS®) and when differences were observed, the effects were quantified using the LSMEANS. All the sperm quality values studied were significantly affected ( $P < 0.001$ ) by cryopreservation (VIT, ORT, HOST). The ORT demonstrated how the acrosome was one of the structures most affected by cryopreservation ( $P < 0.001$ ). In conclusion, the present study confirms that anysosmotic stress affects the sperm cell in an important way, compromising the reference values that quantify semen quality, especially MA and MP.

**Key words:** osmotic stress, semen, sperm quality, ram.

### Resumo

A integridade da membrana plasmática (PM) e do acrossoma (AM) foram dois dos parâmetros mais estudados de avaliação seminal devido ao seu papel predominante como limites celulares e porque são responsáveis por interações celulares eficazes. A fim de avaliar mais objetivamente os efeitos do stress osmótico na integridade PM e AM, bem como a taxa de mudança que ocorre durante a criopreservação seminal, foram avaliados cinco ejaculados recentemente recolhidos, refrigerados a 5 °C e descongelados por morueco/sessão durante 5 semanas consecutivas. A coloração Eosin-nigrosina (EN) foi utilizada para avaliar a vitalidade (VIT), morfo-normalidades e resposta celular após teste de resistência osmótica (ORT) e teste de endosmose osmótica (HOST). O

efeito directo da anisomose e criopreservação sobre as variáveis dependentes foi analisado utilizando o procedimento GLM (SAS®) e quando foram observadas diferenças, os efeitos foram quantificados utilizando LSMEANS. Todos os valores de qualidade de esperma estudados foram significativamente ( $P < 0,001$ ) afectados pela criopreservação (VIT, ORT, HOST). O ORT mostrou como o acrossoma era uma das estruturas mais afectadas pela criopreservação ( $P < 0,001$ ). Em conclusão, o presente estudo confirma que o stress anisomótico afecta significativamente a célula espermática, comprometendo os valores de referência que quantificam a qualidade do esperma, especialmente a MA e a MP.

**Palavras-chave:** stress osmótico, sémén, qualidade do esperma, ovelhas.

## Introducción

Los ovinos en Venezuela tienen un gran potencial socioeconómico, ya que se podrían establecer exitosamente en ecosistemas poco útiles para la crianza de bovinos, obteniendo buenos índices en producción de carne (Villasmil *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de las ventajas comparativas y la diversidad de ambientes a los cuales ellos se adaptan, la disponibilidad de información de programas de mejoramiento reproductivo en estas especies es escasa (Yániz *et al.*, 2015). En zonas tropicales su cría se ha destinado a pequeños productores, en condiciones extensivas, en donde el uso de la tecnología actual es casi inexistente, reportándose solamente en el ámbito científico nacional algunos hallazgos sobre calidad seminal de reproductores utilizados para inseminación artificial (IA) (Rubio-Guillén *et al.*, 2012 y 2014a).

En la industria ovina y en especial en Latinoamérica el uso de la IA con semen criopreservado es prácticamente inexistente, motivado al hecho de que la IA con semen descongelado reporta resultados desfavorables debido a la imposibilidad del operador de depositar el semen al final del cervix o de manera

## Introduction

Sheep in Venezuela have great socioeconomic potential, since they could be successfully established in ecosystems that are not very useful for raising cattle, obtaining good rates of meat production (Villasmil *et al.*, 2011). However, despite the comparative advantages and the diversity of environments to which they adapt, the availability of information on reproductive improvement programs in these species is scarce (Yániz *et al.*, 2015). In tropical areas, their breeding has been destined to small producers, in extensive conditions, where the use of current technology is almost non-existent, with only some findings on the semen quality of rams used for artificial insemination (AI) being reported in the national scientific field (Rubio-Guillén *et al.*, 2012 and 2014a).

In the sheep industry and especially in Latin America, the use of AI with cryopreserved semen is practically non-existent, due to the fact that AI with thawed semen reports unfavorable results due to the inability of the operator to deposit the semen at the end of the cervix or intrauterine way, a fact that favors suboptimal results.

intrauterina, hecho que propicia resultados sub-óptimo. Otra variante importante corresponde a la viabilidad espermática post descongelado que, en ovinos es inferior a la obtenida en toros (Rubio-Guillén, 2017), probablemente debido a que no se ha establecido una presión de selección genética en base a ejemplares buenos congeladores, no obstante, esta situación conduce a buscar nuevas alternativas que evalúen la calidad seminal de muestras destinadas a IA. Las pruebas que miden el estrés osmótico son una alternativa viable, ya que, podrían ser usadas para predecir la congelabilidad (Quintero-Moreno *et al.*, 2005 y 2011; Rubio-Guillén *et al.*, 2014a; Peris-Frau *et al.*, 2020) debido a que el proceso de congelación altera de manera sustancial la osmolaridad del semen.

Basado en la tolerancia osmótica, actualmente existen un gran número de pruebas que someten las muestras seminales a condiciones de baja osmolaridad (Nava-Trujillo *et al.*, 2012; Rubio-Guillén *et al.*, 2014a; Peris-Frau *et al.*, 2020) o alta osmolaridad (Quintero-Moreno *et al.*, 2005) para evaluar la integridad funcional de la MP y/o MA durante todo el proceso y así establecer si hay un alto porcentaje de espermatozoides viables pos descongelación (González-Villalobos, 2017; Peris-Frau *et al.*, 2020). En base a los hechos explicados se pretende analizar si existe una relación estrecha entre la osmo-adaptación de espermatozoides recién colectados, refrigerados, descongelados y la calidad seminal de reproductores ovinos tropicales.

Another important variant corresponds to post-thaw sperm viability, which in sheep is lower than that obtained in bulls (Rubio-Guillén, 2017), probably due to the fact that a genetic selection pressure has not been established based on good freezer specimens, no However, this situation leads to the search for new alternatives that evaluate the seminal quality of samples destined for AI. Tests that measure osmotic stress are a viable alternative, since they could be used to predict freezability (Quintero-Moreno *et al.*, 2005 and 2011; Rubio-Guillén *et al.*, 2014a; Peris-Frau *et al.*, 2020) because the freezing process substantially alters the osmolarity of the semen.

Based on osmotic tolerance, there are currently a large number of tests that subject seminal samples to low osmolarity conditions (Nava-Trujillo *et al.*, 2012; Rubio-Guillén *et al.*, 2014a; Peris-Frau *et al.*, 2020) or high osmolarity (Quintero-Moreno *et al.*, 2005) to evaluate the functional integrity of PM and/or MA throughout the process and thus establish if there is a high percentage of viable sperm after thawing (González-Villalobos, 2017; Peris-Frau *et al.*, 2020). Based on the facts explained, it is intended to analyze whether there is a close relationship between the osmo-adaptation of recently collected, refrigerated, thawed sperm and the seminal quality of tropical sheep breeders.

## Materials and methods

### Location and characterization of the experimental area

The study was carried out at the Centro Experimental de Producción

## Materiales y métodos

### Ubicación y caracterización del área experimental

El estudio fue realizado en el Centro Experimental de Producción Animal (CEPA-LUZ), ubicado en el km 25 a la vía a Perijá, municipio Cañada de Urdaneta, estado Zulia. Zona agroecológicamente caracterizada como bosque seco tropical, a 80 msnm con temperatura anual entre 29,5 y 34 °C (Ewel *et al.*, 1968).

### Unidades experimentales y recolección/procesamiento del semen

Se utilizaron muestras seminales recién colectadas y criopreservadas de cinco ovinos mestizos genéticamente probados y de razas adaptadas a condiciones tropicales (ovejos de pelo con predominio West African, Dorper y Santa Inés). Los eyaculados fueron colectados los días martes y viernes entre las 7:00 y 10:00 de la mañana, mediante vagina artificial temperada a 39 °C, durante cinco semanas consecutivas. Se obtuvieron un total de 25 repeticiones de los cinco ovejoes reproductores adultos (5 x 5). Después de la evaluación seminal de rutina (motilidad, masal e individual y concentración espermática), las muestras clasificadas como idóneas para congelar fueron diluidas con una metodología de un solo paso de criopreservación, mezclando el semen con una solución madre con 20 % de yema de huevo, 60 % de agua estéril bidestilada y 20 % del diluyente comercial Triladyl®.

El primer diluyente crioprotector utilizado contenía yema de huevos frescos de gallinas criollas. El 60 % de

Animal (CEPA-LUZ), located at km 25 road to Perijá, Cañada de Urdaneta municipality, state of Zulia. Agroecologically characterized as a tropical dry forest, at 80 meters above sea level with an annual temperature between 29.5 and 34 °C (Ewel *et al.*, 1968).

### Experimental units and semen collection/processing

Freshly collected and cryopreserved seminal samples from five genetically tested crossbred sheep and breeds adapted to tropical conditions (predominantly West African, Dorper and Santa Inés hair sheep) were used. The ejaculates were collected on Tuesdays and Fridays between 7:00 and 10:00 in the morning, using an artificial vagina tempered at 39 °C, for five consecutive weeks. A total of 25 repetitions were obtained from the five adult breeding sheep (5 x 5). After routine seminal evaluation (motility, mass and individual, and sperm concentration), the samples classified as suitable for freezing were diluted with a one-step cryopreservation methodology, mixing the semen with a stock solution containing 20 % yolk. egg, 60 % sterile double distilled water and 20 % commercial diluent Triladyl®.

The first cryoprotective diluent used contained fresh egg yolk from Creole hens. Sixty percent sterile water was taken from double-distilled diluents. The second cryoprotectant used was based on glycerol recommended for freezing semen of smaller ruminants, 20 % Triladyl®. It was homogenized slowly in a thermostet water bath at 38 °C. After mixing the semen with

agua estéril fue tomada de diluentes bidestilados. El segundo crioprotector utilizado fue con base de glicerol recomendado para la congelación de semen de rumiantes menores, Triladyl® al 20 %. Se homogenizó lentamente en baño maría termoestable a 38 °C. Luego de mezclado el semen con esta solución madre se efectuó el llenado de las minipajuelas de 0,25 mL. Posterior a este tiempo, se procedió a estabilizar las muestras seminales envasadas a 5 °C durante un mínimo de dos horas y un máximo de tres, donde se obtuvo una marcada reducción de movimiento y minimización del gasto de energía, tal como lo recomiendan Rodríguez-Martínez (2000) y Vera-Muñoz (2008).

Al culminar esta estabilización seminal, las minipajuelas fueron congeladas por lotes, en cavas de anime que contenían nitrógeno líquido (NL) en un proceso que constaba de dos pasos. Primeramente, se estabilizaron por 10 minutos en vapores de NL a 5 cm por encima de la superficie, posteriormente se sumergieron en el mismo a -196 °C y se almacenaron en un termo-tanque (MVE®, Millenium).

### **Análisis del semen fresco, refrigerado y congelado**

#### **Vitalidad espermática**

Esta prueba se realizó colocando una gota de 10 µL de semen fresco diluido (1:400) en un portaobjeto a 38 °C sobre una platina termoregular, incluyendo sobre esta gota de semen, 10 µL del colorante supravital EN; al cabo de 30 seg se homogenizó suavemente y se realizó un extendido fino. Los frotis se observaron en un microscopio óptico a 1000X, cuantificando un total de 200 espermatozoides.

this stock solution, the 0.25 mL mini-straws were filled. After this time, the seminal samples packaged at 5 °C were stabilized for a minimum of two hours and a maximum of three, where a marked reduction in movement and minimization of energy expenditure was obtained, as recommended by Rodríguez-Martínez (2000) and Vera-Muñoz (2008).

Upon completion of this seminal stabilization, the mini-straws were batch frozen in styrofoam cellars containing liquid nitrogen (NL) in a two-step process. First, they were stabilized for 10 minutes in NL vapors at 5 cm above the surface, later they were immersed in it at -196 °C and stored in a thermo-tank (MVE®, Millenium).

### **Analysis of fresh, chilled and frozen semen**

#### **Sperm vitality**

This test was performed by placing a 10 µL drop of diluted fresh semen (1:400) on a slide at 38 °C on a thermoregular stage, including on this drop of semen, 10 µL of supravital EN stain; after 30 sec it was gently homogenized and a fine spread was made. The smears were observed in an optical microscope at 1000X, quantifying a total of 200 spermatozoa.

#### **Morphological abnormalities**

With the same smear made to assess sperm vitality, the morphoanomalies of the freshly collected, refrigerated and cryopreserved seminal samples were quantified. For this, the cells were classified according to their appearance into normal and abnormal, and expressed as a percentage (%).

### **Anormalidades morfológicas**

Con el mismo frotis hecho para valorar la vitalidad espermática se cuantificaron las morfoanomalías de las muestras seminales recién recolectadas, refrigeradas y criopreservadas. Para esto, las células fueron clasificadas según su apariencia en normales y anormales, y expresados en porcentaje (%). Estos últimos: defectos de cabeza (número, tamaño y apariencia), defectos de la pieza intermedia (ubicación y apariencia), anomalías en el flagelo (número, forma y tamaño), así como signos de inmadurez en forma de presencia de gota citoplasmática proximal (GCP) y distal (GCD).

### **Evaluación del acrosoma**

Para visualizar su apariencia se utilizó una técnica sencilla con EN para valorar la parte apical del acrosoma en espermatozoides, tal como se ha documentado en experiencias previas en espermio de toros (Rubio-Guillén, 2006), cerdos (Quintero-Moreno *et al.*, 2004), ovinos (Rubio-Guillén *et al.*, 2013) y caprinos (Rubio-Guillén *et al.*, 2014a).

Esta prueba fue realizada al semen fresco, refrigerado y descongelado. Se observó presencia del acrosoma intacto (NAR) y cuando el mismo estuvo ausente, o alterado se contabilizó como acrosoma alterado (*Damage Apical Ridge*), y cuando estaba ausente fue cuantificado como MAR (*Missing Apical Ridge*). El resultado final de NAR, DAR y MAR se expresó en porcentaje (%).

The latter: head defects (number, size and appearance), intermediate piece defects (location and appearance), abnormalities in the flagellum (number, shape and size), as well as signs of immaturity in the form of the presence of a proximal cytoplasmic drop (GCP) and distal (GCD).

### **Acrosome evaluation**

To visualize its appearance, a simple technique with EN was used to assess the apical part of the acrosome in sperm, as has been documented in previous experiences with sperm from bulls (Rubio-Guillén, 2006), pigs (Quintero-Moreno *et al.*, 2004), sheep (Rubio-Guillén *et al.*, 2013) and goats (Rubio-Guillén *et al.*, 2014a).

This test was performed on fresh, chilled and thawed semen. Presence of intact acrosome (NAR) was observed and when it was absent or altered it was counted as altered acrosome (Damage Apical Ridge), and when it was absent it was quantified as MAR (Missing Apical Ridge). The final result of NAR, DAR and MAR was expressed as a percentage (%).

### **Modified Endosmosis Test (HOST-EN)**

The HOST-EN test was performed by subjecting a 50  $\mu$ L sample of fresh, chilled and thawed semen to two hypotonic media, the first was 154 mOsm.L<sup>-1</sup>, and the second was 102 mOsm.L<sup>-1</sup>, for both. In cases, the incubation was for 30 minutes, in 1.5 mL eppendorf tubes where 500  $\mu$ L of these hypotonic solutions were added, tempered in a water bath at 38 °C. After this incubation time, the sperm were counted up to a total of



### Prueba de Endosmosis modificada (HOST-EN)

La prueba HOST-EN se realizó sometiendo una muestra de 50  $\mu\text{L}$  de semen fresco, refrigerado y descongelado a dos medios hiposmóticos, el primero, fue de 154  $\text{mOsm.L}^{-1}$ , y el segundo de 102  $\text{mOsm.L}^{-1}$ , para ambos casos la incubación fue durante 30 minutos, en tubos eppendorf de 1,5 mL donde se agregaban 500  $\mu\text{L}$  de estas soluciones hiposmóticas, temperadas en un baño de maría a 38 °C. Transcurrido este tiempo de incubación, se contaron los espermatozoides hasta un total de 100, observando la reacción positiva (figura 1; tomada de Rubio-Guillén *et al.*, 2014a). Se categorizaron las muestras evaluadas en cuatro categorías, expresadas en porcentaje (%), tal como se explica:

Espermatozoides no coloreados con eosina (VIVOS) y flagelos enrollados (+HOST).

Espermatozoides coloreados con eosina (MUERTOS) y flagelos enrollados (+HOST).

Espermatozoides no coloreados con eosina (VIVOS) y flagelos no enrollados (-HOST).

Espermatozoides coloreados con eosina (MUERTOS) y flagelos no enrollados (-HOST).

### Osmotic resistance test (ORT)

#### Prueba de resistencia osmótica (ORT)

En un baño de maría a 38 °C (tubo de 1,5 mL) se incubó una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  del semen fresco, refrigerado y descongelado durante 30 minutos en un medio hiposmótico (ORT) de

100, observando la positiva reacción (Figure 1; taken from Rubio-Guillén *et al.*, 2014a). The samples evaluated were categorized into four categories, expressed as a percentage (%), as explained:

Spermatozoa not stained with eosin (LIVE) and coiled flagella (+HOST).

Eosin-stained sperm (DEAD) and coiled flagella (+HOST).

Spermatozoa not stained with eosin (LIVE) and flagella not coiled (-HOST).

Eosin-stained sperm (DEAD) and unrolled flagella (-HOST).

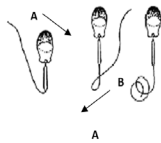
#### Osmotic resistance test (ORT)

In a 38 °C water bath (1.5 mL tube), a 50  $\mu\text{L}$  aliquot of fresh, refrigerated and thawed semen was incubated for 30 minutes in a hyposmotic medium (ORT) of 154  $\text{mOsm.L}^{-1}$ . A small drop was taken and mixed gently with 10  $\mu\text{L}$  of the EN dye. In the light microscope, 100 sperm were counted and the acrosomic reactions already described (DAR and MAR) were observed.

In the present study, a slight modification was made to the initial test described by Schilling and Vengust (1985), obviating the gentle centrifugation step to concentrate sperm. Two aliquots of 50  $\mu\text{L}$  fresh, chilled or thawed semen were taken. One of the samples was placed in 500  $\mu\text{L}$  of the hyposmotic medium (102 or 154  $\text{mOsm.L}^{-1}$ ) and the other, in a control. After incubating the samples, the stained smears were evaluated in an optical microscope and directly on the slide, the spermatozoa were counted up to a total of 100, observing the number of altered acrosomes (MAR or DAR, figure 2; Rubio-Guillén *et al.*,

154 mOsm.L<sup>-1</sup>. Una pequeña gota fue tomada y mezclada suavemente con 10 µL del colorante EN. En el microscopio óptico, se contaban 100 espermatozoides y se observaron las reacciones acrosómicas ya descritas (DAR y MAR).

2012). The total DAR or MAR of the hypotonic medium and the isosmotic medium was added, divided by two and the final result was obtained, expressed as a percentage (% ORT = (% DAR/MAR hypotonic medium + % DAR/MAR isosmotic medium)/2).



A



B

**Figura 1. A. Representación esquemática de espermatozoides reaccionados positivamente a la prueba. B. Espermatozoides de rumiantes reaccionados a la prueba (Enrollados).**

**Figure 1. A. Schematic representation of spermatozoa reacted positively to test. B. Sperm from ruminants reacted to test (Coiled).**

En el presente estudio, se realizó una modificación leve a la prueba inicial descrita por Schilling y Vengust (1985), obviando el paso de centrifugado suave para concentrar espermatozoides. Se tomaron dos alícuotas de semen fresco, refrigerado o descongelado de 50 µL. Una de las muestras se colocó en 500 µL del medio hiposmótico (de 102 ó 154 mOsm.L<sup>-1</sup>) y la otra, en un testigo. Luego de incubar las muestras, los frotis teñidos se evaluaron en un microscopio óptico y directamente sobre el portaobjetos

**Statistic analysis**

The variables (vitality, DAR, ORT, HOST-EN) of the fresh semen samples just collected, refrigerated and thawed from each of the five adult sheep were evaluated using the General Linear Model. When significant effects of the independent variables were found on the dependent variables, the effect was quantified using the LSMEANS procedure. The mathematical model used was:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A(T)_{j(i)} + \epsilon_{ijk}$$

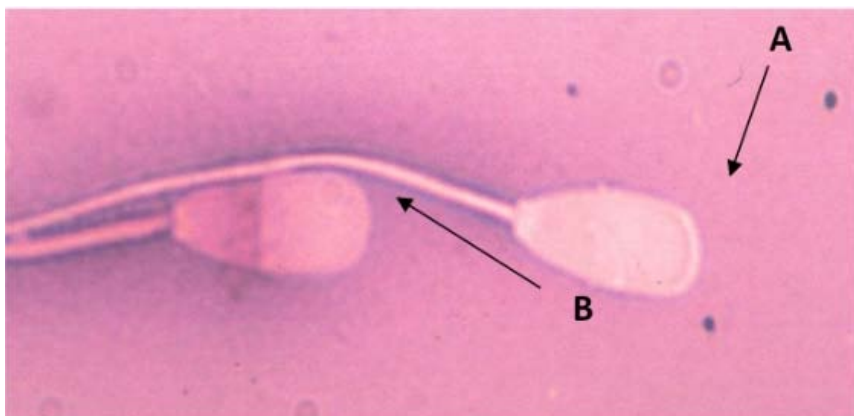
Where:

se contaron los espermatozoides hasta un total de 100, observando el número de acrosomas alterados (MAR o DAR, figura 2; Rubio-Guillén *et al.*, 2012). Se sumó el total de DAR o MAR del medio hiposmótico y del medio isosmótico, se dividió entre dos y se obtuvo el resultado final, expresado en porcentaje (%ORT= (%DAR/MAR medio hiposmótico + %DAR/MAR medio isosmótico)/2).

$Y_{ijk}$  = Response translated into semen quality assessment parameters, which included assessment tests of the structural integrity of the PM and MA (vitality and DAR), and assessment tests of the functional integrity of the MP and MA (ORT and HOST-EN).

$\mu$  = general mean.

$T_i$  = effect of the  $i$ -th treatment ( $i$  = fresh/chilled/thawed semen).



**Figura 2. Espermatozoides de rumiante teñidos con eosina-nigrosina (A: espermatozoide con acrosoma intacto, B: espermatozoide con pérdida del acrosoma).**

**Figure 2. Ruminant sperm stained with eosin-nigrosin (A: sperm with intact acrosome, B: sperm with loss of acrosome).**

### **Análisis estadístico**

Las variables (vitalidad, DAR, ORT, HOST-EN) de las muestras de semen fresco recién recolectado, refrigerado y descongelado proveniente de cada uno de los cinco ovinos adultos, fueron evaluadas utilizando el Modelo Lineal General. Cuando se encontraron

$A(T)_j(i)$  = effect of the  $j$ -th animal nested within the  $i$ -th treatment.

$e_{ijk}$  = experimental error, assumed normal and independently distributed with zero mean and variance  $\sigma^2$  DNI  $\sim (0, \sigma^2$  DNI).

The effect of anisomosis and seminal freezing (nesting the animal

efectos significativos de las variables independientes sobre las dependientes, se cuantificó el efecto mediante el procedimiento LSMEANS. El modelo matemático utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A(T)_j(i) + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

$Y_{ijk}$  = Respuesta traducida en parámetros de valoración de la calidad seminal, que incluyeron pruebas de valoración de la integridad estructural de la MP y MA (vitalidad y DAR), y pruebas de valoración de la integridad funcional de la MP y MA (ORT y HOST-EN).

$\mu$  = media general.

$T_i$  = efecto del  $i$ -ésimo tratamiento ( $i$  = semen fresco/refrigerado/descongelado).

$A(T)_{j(i)}$  = efecto del  $j$ -ésimo animal anidado dentro del  $i$ -ésimo tratamiento.

$\varepsilon_{ijk}$  = error experimental, asumido normal e independientemente distribuido con media cero y varianza  $\sigma^2 \text{DNI} \sim (0, \sigma^2 \text{DNI})$ .

Se evaluó el efecto de la anisomosis y congelación seminal (anidando la variable animal) sobre los parámetros de integridad de la MP y MA. Los datos fueron analizados mediante el SAS (Statistical Analysis System software 8.2), para Windows (SAS Inst. Inc., Cary, NC. USA).

## Resultados y discusión

### Valoración de la calidad seminal en las muestras frescas, refrigeradas y descongeladas de ovinos tropicales

Se presentaron un promedio de motilidad individual progresiva,

variable) on the integrity parameters of the MP and MA was evaluated. The data were analyzed using SAS (Statistical Analysis System software 8.2), for Windows (SAS Inst. Inc., Cary, NC. USA).

## Results and discussion

### Evaluation of semen quality in fresh, chilled and thawed samples of tropical sheep

There was an average of progressive individual motility, measured subjectively and for fresh semen of 76.02 %. The average volume of the ejaculates was 0.84 mL, the concentration was  $2.66 \times 10^9 \text{ spz.mL}^{-1}$  and the percentage of mass motility (1-5) was 4.05. The general means ( $\mu$ ) and the standard error (EE) of characteristics evaluated in fresh, chilled and thawed semen of sheep are shown in Table 1.

All the fresh seminal samples had a pH close to neutrality with an average of 7.61. These five basic parameters coincide in rank similarity with those reported by other authors in different latitudes (Anel *et al.*, 2003; García, 2014; Yániz *et al.*, 2015), even with authors working in tropical areas (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008; Valdez, 2013; Vargas, 2015). Sheep have a low-volume ejaculate with a high sperm concentration that allows AI to work with mini-straws with doses ranging between 20 and 200 million per dose (Valdez, 2013). In this case, the dilution was made based on  $50 \times 10^6 \text{ dose}^{-1}$ , similar to that reported in other trials (Valdez, 2013).

DAR (%): porcentaje de acrosomas reaccionados o alterados. MAR (%):

medida subjetivamente y para el semen fresco de 76,02 %. El volumen promedio de los eyaculados fue de 0,84 mL, la concentración de  $2,66 \times 10^9$  spz.  $\text{mL}^{-1}$  y el porcentaje de motilidad masal (1-5) de 4,05. Las medias generales ( $\mu$ ) y el error estándar (EE) de las características evaluadas en semen fresco, refrigerado y descongelado de los ovinos se muestran en el cuadro 1.

Todas las muestras seminales en fresco tuvieron un pH cercano a la neutralidad con 7,61 de promedio. Estos cinco parámetros básicos coinciden en similitud de rango, con los reportados por otros autores en distintas latitudes (Anel *et al.*, 2003; García, 2014; Yániz *et al.*, 2015), inclusive con autores trabajando en zonas tropicales (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008; Valdez, 2013; Vargas, 2015). Los ovinos cuentan con un eyaculado bajo en volumen y de alta concentración espermática que permite trabajar la IA con minipajuelas con dosis que oscilan entre 20 y 200 millones por dosis (Valdez, 2013). En este caso, la dilución fue hecha en base a  $50 \times 10^6$ . dosis<sup>-1</sup>, similar a lo reportado en otros ensayos (Valdez, 2013).

Se observó el efecto detrimental del proceso de criopreservación seminal sobre los parámetros de evaluación de la calidad espermática ( $P < 0,01$ ), encontrándose disminución progresiva del porcentaje de vitalidad durante el enfriamiento de 73,02 a 50,25 % y luego por la criopreservación propiamente dicha 24,59%, presentándose diferencias ( $P < 0,001$ ) cuantificables entre los tres tratamientos; mientras que el porcentaje de acrosomas dañados fue de 18,60 % (reflejados en

porcentaje de acrosomas reaccionados o alterados. NAR (%): porcentaje de acrosomas no reaccionados o alterados. Total anomalías (%): incluye las morfoanomalías de la cabeza y flagelo espermático. ORT (%): espermatozoides reaccionados a la prueba de resistencia osmótica. HOST+EN- (%): espermatozoides positivos a la prueba de endósmosis.

The detrimental effect of the seminal cryopreservation process on the sperm quality evaluation parameters ( $P < 0.01$ ) was observed, finding a progressive decrease in the percentage of vitality during cooling from 73.02 to 50.25 % and then by the cryopreservation itself 24.59 %, with quantifiable differences ( $P < 0.001$ ) between the three treatments; while the percentage of damaged acrosomes was 18.60 % (reflected in DAR (3.94 %) and MAR (14.72 %) for the newly collected ejaculates and DAR of 14.36 % and 16.44 % for the refrigerated and cryopreserved semen, respectively.

When describing the treatments carried out in this trial (freshly collected, refrigerated, thawed) it is important to note that ruminant sperm are especially sensitive to cold damage (Hammerstedt *et al.*, 1990), and in the case of bulls and rams, is probably due to an unsuitable relationship between cholesterol and phospholipids (Vera-Muñoz, 2008), as well as a lower ratio of polyunsaturated/saturated fatty acids in their PM, when compared to species such as rabbit, man or dog (Giraud *et al.*, 2000). For this reason, steps such as the addition of the cryoprotectant, cooling, freezing, storage in liquid nitrogen and thawing

DAR (3,94 %) y MAR (14,72 %) para los eyaculados recién recolectados y DAR de 14,36 % y 16,44 % para el semen refrigerado y criopreservado, respectivamente.

cause a greater deterioration in PM and MA (Zhu and Liu, 2000; Utt, 2015), which is observed reflected in this trial by reporting a decrease in individual motility and vitality upon

**Cuadro 1. Características generales (μEE) en el semen fresco, refrigerado y descongelado de ovinos tropicales.**

**Table 1. General characteristics (μEE) in fresh, chilled and thawed semen of tropical sheep.**

Características	FYW/fb FYW <sup>a</sup> YWLX <sup>c</sup>	Refrigerado	Descongelado
Vitalidad (%)	73,02 ± 1,79 <sup>a</sup>	50,25 ± 2,78 <sup>b</sup>	24,59 ± 1,39 <sup>c</sup>
DAR (%)	3,94 ± 1,02 <sup>b</sup>	14,36 ± 2,25 <sup>a</sup>	16,44 ± 1,11 <sup>a</sup>
MAR (%)	14,72 ± 1,83 <sup>c</sup>	32,37 ± 4,03 <sup>b</sup>	59,72 ± 1,99 <sup>a</sup>
NAR (%)	81,68 ± 1,54 <sup>a</sup>	53,28 ± 3,38 <sup>b</sup>	23,80 ± 1,67 <sup>c</sup>
Total gotas (%)	0,10 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,03 <sup>a</sup>
Cabeza Anormal (%)	5,60 ± 1,17 <sup>b</sup>	10,95 ± 2,59 <sup>a</sup>	10,92 ± 1,27 <sup>a</sup>
ORT (%)	80,91 ± 0,09 <sup>a</sup>	74,55 ± 1,90 <sup>b</sup>	68,88 ± 1,07 <sup>b</sup>
HOST+EN- (%)	75,27 ± 1,42 <sup>a</sup>	48,52 ± 3,13 <sup>b</sup>	26,78 ± 1,55 <sup>c</sup>

Valores entre paréntesis denotan intervalos de confianza de la variable estudiada DAR (%): porcentaje de acrosomas reaccionados o alterados. MAR (%): porcentaje de acrosomas reaccionados o alterados. NAR (%): porcentaje de acrosomas no reaccionados o alterados. Total anomalidades (%): incluye las morfoanomalías de la cabeza y flagelo espermático. ORT (%): espermatozoides reaccionados a la prueba de resistencia osmótica. HOST+EN- (%): espermatozoides positivos a la prueba de endósomosis. <sup>a,b,c</sup>Letras diferentes denotan diferencias estadísticas significativas (P<0,001).

Values in parentheses denote confidence intervals of the variable studied DAR (%): percentage of reacted or altered acrosomes. MAR (%): percentage of reacted or altered acrosomes. NAR (%): percentage of unreacted or altered acrosomes. Total abnormalities (%): includes head morfoanomalies and spermatic flagellum. ORT (%): sperm reacted to the osmotic resistance test. HOST+EN- (%): positive sperm to endosmosis test. <sup>a, b, c</sup>Different letters denote statistically significant differences (P <0.001).

Al describir los tratamientos realizados en este ensayo (recién recolectado, refrigerado, descongelado) es importante destacar que, los espermatozoides de rumiantes son especialmente sensibles al daño por frío (Hammerstedt *et al.*, 1990), y para el caso del toro y el morueco, probablemente se deba a una relación no idónea entre colesterol y fosfolípidos (Vera-Muñoz, 2008), así como, una menor relación ácidos

thawing (Foote and Parks, 1993; Guillaume *et al.*, 2004).

Parameters as important as VIT (73.02 % vs. 50.25 % vs. 24.59 %) and NAR (81.68 % vs. 53.28 % vs. 23.80 %) substantially worsened when increasing the cold level (fresh vs chilled vs defrosted), respectively. Some authors comment that just by diluting the samples to start cryoprocessing, the percentage of live spermatozoa can be affected

grasos polinsaturados/saturados en su MP, si se comparan con especies como el conejo, hombre o perro (Giraud *et al.*, 2000). Por esta razón, pasos como la adición del crioprotector, el enfriamiento, la congelación, el almacenamiento en nitrógeno líquido y la descongelación causan un deterioro mayor en la MP y MA (Zhu y Liu, 2000; Utt, 2015), lo cual se observa reflejado en este ensayo al reportarse una disminución de la motilidad individual y vitalidad al descongelado (Foote y Parks, 1993; Guillaume *et al.*, 2004).

Parámetros tan importantes como la VIT (73,02 % *vs.* 50,25 % *vs.* 24,59 %) y el NAR (81,68 % *vs.* 53,28 % *vs.* 23,80 %) empeoraron sustancialmente al incrementar el nivel de frío (fresco, *vs.* refrigerado *vs.* descongelado), respectivamente. Algunos autores comentan que con solo diluir las muestras para comenzar el crioprocesado, se puede afectar hasta un 30% el porcentaje de espermatozoides vivos, en lo que se llama “efecto dilutor” (Leahy *et al.*, 2010), sin contar el bien conocido “estrés por frío” que puede ocurrir cuando las muestras son llevadas de 38 a 5°C para su estabilización (Vera-Muñoz, 2001; Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008) o el paso por el punto de congelación en el descenso térmico desde 5 hasta el -196 °C de la temperatura de permanencia en NL “fase de transición termotrópica”, donde puede ocurrir un daño subletal sobre todo en la MA, producto de la crioinjuria (Varisli *et al.*, 2009; Valdez, 2013).

by up to 30 %, in what is called the “dilutor effect” (Leahy *et al.*, 2010), not counting the well-known “Cold stress” that can occur when the samples are brought from 38 to 5 °C for their stabilization (Vera-Muñoz, 2001; Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008) or the passage through the freezing point in the thermal decrease from 5 up to -196 °C of the temperature of permanence in NL “thermotropic transition phase”, where a sublethal damage can occur especially in the MA, product of cryoinjuria (Varisli *et al.*, 2009; Valdez, 2013).

The seminal freezing protocol was done in a single step, unlike many authors who work with the two-step technique (Anel *et al.*, 2003; Yániz *et al.*, 2015). The problem of glycerization at laboratory temperature (25 °C) is the effect on post-thaw sperm viability, due to the toxic effects that have been reported for a long time (Rodríguez-Martínez, 2000). However, working in this way and quickly allows greater stabilization in the final freezing container in NL, which avoids changes in temperatures in the artisanal filling and stamping, after the seminal samples have already been cooled. In cold stress (5 °C), the main changes include reduced motility and morphological integrity of the sperm (García, 2014). These changes contribute to the accumulation of toxic metabolic products, mainly reactive oxygen species formed by the peroxidation of the membranes (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008).

In the case of MAR in the 32.37 % chilled and thawed semen (MAR: 59.72 %), this variable is affected by

El protocolo de congelación seminal se hizo a un solo paso a diferencia de muchos autores que trabajan con la técnica de dos pasos (Anel *et al.*, 2003; Yániz *et al.*, 2015). El problema de la glicerización a temperatura de laboratorio (25°C) es la afectación de la viabilidad espermática post-descongelación, debido a los efectos tóxicos que han sido reportados desde hace mucho tiempo atrás (Rodríguez-Martínez, 2000). Sin embargo, trabajar así y de manera rápida permite mayor estabilización en el recipiente final de congelación en NL, lo que evita los cambios de temperaturas en el llenado y timbrado artesanal, luego que ya han sido enfriadas las muestras seminales. En el estrés por frío (5 °C), los principales cambios incluyen reducción de la motilidad e integridad morfológica del espermatozoide (García, 2014). Estos cambios contribuyen a la acumulación de productos tóxicos del metabolismo, principalmente especies reactivas de Oxígeno formados por la peroxidación de las membranas (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008).

Para el caso de los MAR en el semen refrigerado de 32,37 % y descongelado (MAR: 59,72 %), se ve afectada esta variable por el daño criogénico producido a las muestras procesadas. Lo anterior indica, que el porcentaje de NAR disminuyó abruptamente de 81,68 % a 32,37 % con el daño por frío, y posteriormente desciende a 23,80 % al ser congelado en NL; estos valores son similar a lo reportado para ovinos de pelo en condiciones tropicales (Vargas, 2015). Pursel y Johnson (1974) plantearon por primera vez

the cryogenic damage produced to the processed samples. The foregoing indicates that the percentage of NAR decreased abruptly from 81.68 % to 32.37 % with the cold damage, and later it drops to 23.80 % when frozen in NL; These values are similar to those reported for hair sheep in tropical conditions (Vargas, 2015). Pursel and Johnson (1974) proposed for the first time that AM could be affected by cryopreservation action, however, the structural integrity of PM could not be damaged (Zhu and Liu, 2000), suggesting that the damage of each domain of PM can occur independently (Chan *et al.*, 1991; Peris-Frau *et al.*, 2020).

During the cryo-capacitation that can occur in the cryogenic processing of the samples, the proteins within the PM of the sperm migrate thanks to the loss of intramembrane cholesterol, thus forming domains with or without the latter (Vera-Muñoz, 2001). In areas where there are no proteins, the MP and MA will fuse. This fusion begins the exocytosis process of AM (Dacheux and Dacheux, 2001).

The ability of the sperm to perform this acrosome reaction, in response to contact with the zona pellucida, can be used as an indication of sperm fertility (Dzuik, 1996; Utt, 2015). In eutherian mammalian sperm, it has been postulated that premature acrosome loss prevents sperm-oocyte fusion (Yanagimachi, 1994; Peris-Frau *et al.*, 2020). Only spermatozoa that can perform the acrosomal reaction in synchronization with the penetration phase of the oocyte, have the ability to pass through the zona



que la MA podría afectarse por acción de la criopreservación, no obstante, la integridad estructural de la MP podría no sufrir daño (Zhu y Liu, 2000), sugiriendo que el daño de cada dominio de la MP puede producirse de manera independiente (Chan *et al.*, 1991; Peris-Frau *et al.*, 2020).

Durante la criocapacitación que puede ocurrir en el procesado criogénico de las muestras, las proteínas dentro de la MP del espermatozoide migran gracias a la pérdida de colesterol intramembrana, formando así dominios con o sin estas últimas (Vera-Muñoz, 2001). En las zonas donde no hay proteínas se fusionará la MP y la MA. Esa fusión comienza el proceso de exocitosis de la MA (Dacheux y Dacheux, 2001).

La habilidad del espermatozoide para realizar esta reacción del acrosoma, en respuesta al contacto con la zona pelúcida, puede ser utilizada como un indicativo de fertilidad del espermatozoide (Dzuik, 1996; Utt, 2015). En espermatozoides de mamíferos euterianos se ha postulado que, la pérdida prematura del acrosoma, previene la fusión del espermatozoide con el ovocito (Yanagimachi, 1994; Peris-Frau *et al.*, 2020). Sólo los espermatozoides que pueden realizar la reacción acrosomal de manera sincronizada con la fase de penetración del ovocito, tienen la habilidad de pasar a través de la zona pelúcida y, como consecuencia, fusionarse con este, para formar un embrión (Tesarik *et al.*, 1993; Januskauskas y Rodríguez-Martínez., 2000). Aunque en ratones, se ha demostrado, como espermatozoides

pellúcida and, as a consequence, fuse with it, to form an embryo (Tesarik *et al.*, 1993; Januskauskas and Rodríguez-Martínez., 2000). Although in mice, it has been shown that sperm with acrosomal reaction prior to contact with ZP3 have an affinity for penetration to this glycoprotein membrane (Jin *et al.*, 2011).

In light of the findings made in sheep, the idea is still maintained that any damage to the MA would cause its contentive enzymes to be released, preventing fertilization, so that, as mentioned above, if the percentage of these alterations is high, it can cause a decrease in fertility (Rubio-Guillén, 2006; Díaz *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2019). Furthermore, if it is known that this structure is one of the most affected after cryopreservation (Hammersedt *et al.*, 1990; Rubio-Guillén *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2012).

Ejaculates in which a large part of the sperm have lost their acrosomes will show lower fertility (Rubio-Guillén, 2006; Díaz *et al.*, 2012; Utt, 2015). In cattle experiments, the induction of the acrosome reaction with the ionophore A23187 was marginally correlated with *in vivo* fertility (Januskauskas *et al.*, 2000). It can be hypothesized that the length of the sperm head may be related to the presence of an intact acrosome (Chen *et al.*, 2019). In contrast, it has been correlated with the sperm morphometry of subpopulations that showed high fertility, when compared with their contemporaries who presented

con reacción acrosomal previa al contacto con la ZP<sub>3</sub> presentan afinidad por penetración a esta membrana glicoprotéica (Jin *et al.*, 2011).

A la luz de los hallazgos hechos en ovinos, se sigue manteniendo la idea que, cualquier daño en la MA provocaría que se liberen sus enzimas contentivas, impidiendo la fecundación, de forma que, como se mencionó anteriormente, si el porcentaje de estas alteraciones es elevado, puede provocar un descenso de la fertilidad (Rubio-Guillén, 2006; Díaz *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2019). Más aún, si se sabe que esta estructura es una de las mayormente afectadas luego de la criopreservación (Hammersedt *et al.*, 1990; Rubio-Guillén *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2012).

Los eyaculados en los que gran parte de los espermatozoides han perdido sus acrosomas mostraron menor fertilidad (Rubio-Guillén, 2006; Díaz *et al.*, 2012; Utt, 2015). En experiencias con vacunos, la inducción de la reacción acrosómica con el ionóforo A23187 fue correlacionada marginalmente con la fertilidad *in vivo* (Januskauskas *et al.*, 2000). Se puede hipotetizar que el largo de la cabeza espermática puede ser relacionado con la presencia de un acrosoma intacto (Chen *et al.*, 2019). En contraparte, se ha correlacionado con la morfometría espermática de subpoblaciones que mostraron una fertilidad alta, al compararlo con sus coetáneos que presentaban fertilidades medias y bajas (Rubio-Guillén, 2006).

### **Efecto del cambio de osmolaridad sobre la MA y MP**

En el cuadro 2, se pudo evaluar el resultado de las pruebas de resistencia

medium and low fertility (Rubio-Guillén, 2006).

### **Effect of the change in osmolarity on MA and MP**

In Table 2, it was possible to evaluate the result of the osmotic resistance tests on the structural and functional integrity of MP and MA in various anisotonic conditions (with emphasis on 154 and 102 mOsm.L<sup>-1</sup>). In the case of structural integrity, a marked effect of cryoprocessing was seen between fresh and thawed samples of all osmolar categories (VIT and DAR; P < 0.001). Also finding significant statistical differences (P < 0.001) between isosmolar vs. hyposmotic. From 79 % VIT for fresh semen, a detriment of 9% was evidenced in the 154 mOsm.L<sup>-1</sup> anisotonic condition and up to 16 % for the 102 mOsm.L<sup>-1</sup> osmolar condition. In contrast, cryopreserved semen did not show an apparent decrease between hyposmolar treatments (P > 0.01). For all test results, no differences (P > 0.01) were found between the control samples (undiluted) and those diluted in an isosmolar incubation medium of 308 mOsm.L<sup>-1</sup>; same evidence, when comparing fresh and cryopreserved samples incubated in hyposmotic conditions of 102 mOsm.L<sup>-1</sup> vs. 154 mOsm.L<sup>-1</sup>.

Regarding the evaluation of the functionality of the MP and MA, of the two tests carried out in this experiment HOST-EN and ORT, only the ORT did not present highly significant differences (P > 0.01), although its numerical differences were notable; between refrigerated and thawed semen (74.55 % vs. 68.88 %; P > 0.05).

osmótica sobre la integridad estructural y funcional de MP y MA en varias condiciones de anisomosis (con énfasis en 154 y 102 mOsm.L<sup>-1</sup>). Para el caso de la integridad estructural se vio un efecto marcado del crioprocésado entre las muestras frescas y descongeladas de todas las categorías osmolares (VIT y DAR; P<0,001). Encontrándose así mismo, diferencias estadísticas significativas (P<0,001) entre los tratamientos isosmolares *vs.* hiposmóticos. Desde un 79 % de VIT para el semen fresco se evidenció un detrimento de 9 % en la condición anisomótica de 154 mOsm.L<sup>-1</sup> y de hasta 16 % para la condición osmolar de 102 mOsm.L<sup>-1</sup>. En contraparte, el semen criopreservado no evidenció disminución aparente entre los tratamientos hiposmolares (P>0,01). Para todos los resultados de las pruebas no se encontraron diferencias (P>0,01) entre las muestras control (sin diluir) y las diluidas en un medio de incubación isosmolar de 308 mOsm.L<sup>-1</sup>; misma evidencia, al comparar las muestras frescas y criopreservadas incubadas en condiciones hiposmóticas de 102 mOsm.L<sup>-1</sup> *vs.* 154 mOsm.L<sup>-1</sup>.

En cuanto a la evaluación de la funcionalidad de la MP y MA, de las dos pruebas realizadas en este experimento HOST-EN y ORT, solo el ORT no presentó diferencias altamente significativas (P>0,01), aunque sus diferencias numéricas fueron notables; entre el semen refrigerado y descongelado (74,55 % *vs.* 68,88 %; P>0,05). En oposición, el HOST presentó una disminución detectable estadísticamente (P<0,001) entre los tres tratamientos realizados, quedando como sigue: HOST (75,27

In contrast, the HOST presented a statistically detectable decrease (P <0.001) among the three treatments performed, being as follows: HOST (75.27 % *vs.* 48.52 *vs.* 26.78 %) for the freshly collected, refrigerated semen and thawed, respectively. Sperm functionality in terms of resistance to anisomotic incubation has been shown to correlate with *in vitro* fertility (Jeyendran *et al.*, 1984), as well as with the fertility of ruminant females (Rubio-Guillén, 2006).

As some authors (Zhu and Liu, 2000; Peris-Frau *et al.*, 2020) have postulated that the structural and functional damage of the sperm membrane domains can occur individually and not dependently, in this trial, tests were performed structural (NAR) and functional (ORT) assessment of MA and MP (VIT and HOST-EN). All this, looking for a unique test that could evaluate various aspects related to semen quality and correlate them with *in vivo* fertility (Rubio-Guillén *et al.*, 2014b).

Two hypotonic conditions were used in this study (102 and 154 mOsm.L<sup>-1</sup>) in search of differences in resistance to anisomosis and for the detection of false negatives, since it has been published that hypotonic conditions are recommended for sheep. lower than in large ruminants (Anel *et al.*, 2003). However, under the conditions in which this test was carried out, no statistically significant differences (P> 0.001) were observed between both conditions for any of the three treatments. Reliable conclusion that allows the use of both osmolarities to observe the response to hypotonic

% vs. 48,52 vs. 26,78 %) para el semen recién recolectado, refrigerado y descongelado, respectivamente. La funcionalidad espermática en términos de resistencia a incubación anisotérmica ha sido demostrada que presenta una correlación con la fertilidad *in vitro* (Jeyendran *et al.*, 1984), así como también con la fertilidad de hembras rumiantes (Rubio-Guillén, 2006).

incubation, without detriment to the response due to the appearance of false negatives. For this reason, in sheep this test is still used today, as a faithful estimator of the functional integrity of the PM, as shown by some studies (Valdez, 2013; García, 2014). In ruminants, high and positive correlations have been reported between HOST and the percentage

**Cuadro 2. Efecto del estrés anisotérmico sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides ovinos.**

**Table 2. Effect of anisotermic stress on the structural and functional integrity of the plasma and acrosomal membrane of sheep spermatozoa.**

Parámetro		Osmolaridad (mOsm.L <sup>-1</sup> )			
		Fresco	Descongelado	Crioinjuria	Descongelado
Vitalidad (%)	Fresco	79,42 <sup>a</sup> ± 2,56	79,31 <sup>a</sup> ± 2,56	70,38 <sup>ab</sup> ± 2,60	62,97 <sup>b</sup> ± 2,56
	Descongelado	31,81 <sup>a</sup> ± 2,74	23,31 <sup>a</sup> ± 2,79	22,60 <sup>a</sup> ± 2,69	20,66 <sup>a</sup> ± 2,90
	Crioinjuria	-47,61*	-56*	-47,78*	-42,31*
NAR (%)	Fresco	86,31 <sup>a</sup> ± 3,06	85,29 <sup>a</sup> ± 3,05	80,39 <sup>a</sup> ± 3,10	74,73 <sup>a</sup> ± 3,05
	Descongelado	32,98 <sup>a</sup> ± 3,27	33,05 <sup>a</sup> ± 3,39	19,91 <sup>ab</sup> ± 3,26	9,25 <sup>b</sup> ± 3,46
	Crioinjuria	-53,33*	-52,24*	-60,48*	-65,40*
HOST+EN- (%)	Fresco	76,44 <sup>a</sup> ± 2,83	74,61 <sup>a</sup> ± 2,83	77,19 <sup>a</sup> ± 2,82	72,86 <sup>a</sup> ± 2,82
	Descongelado	29,13 <sup>a</sup> ± 3,02	28,32 <sup>a</sup> ± 3,13	24,76 <sup>a</sup> ± 3,02	24,92 <sup>a</sup> ± 3,20
	Crioinjuria	-47,31*	-46,29*	-52,43*	-47,94*
ORT (%)	Fresco	86,38 <sup>a</sup> ± 1,97	86,30 <sup>a</sup> ± 1,96	70,00 <sup>b</sup> ± 2,00	63,55 <sup>b</sup> ± 1,96
	Descongelado	53,22 <sup>a</sup> ± 2,11	43,74 <sup>a</sup> ± 2,14	25,10 <sup>ab</sup> ± 2,06	29,47 <sup>b</sup> ± 2,22
	Crioinjuria	-43,16*	-42,56*	-44,90*	-34,08*

Los resultados son expresados en media aritmética ± desviación estándar para las muestras de semen analizadas de los 5 ovinos. ORT (%): espermatozoides reaccionados a la prueba de resistencia osmótica. NAR (%): Porcentaje de acrosomas normales en los espermatozoides evaluados. HOST+EN- (%): espermatozoides positivos a la prueba de endosmosis y no teñidos con Eosina.

<sup>a,b,c</sup>Letras diferentes en las filas denotan diferencias estadísticas significativas (P<0,01).

\*Diferencias estadísticas significativas (P<0,01) entre columnas denotando daño por congelación.

The results are expressed as arithmetic mean ± standard deviation for the analyzed semen samples from the 5 sheep. ORT (%): sperm reacted to the osmotic resistance test. NAR (%): Percentage of normal acrosomes in the sperm evaluated. HOST+EN- (%): sperm positive to endosmosis test and not stained with Eosin.

<sup>a, b, c</sup>Different letters in the rows denote statistically significant differences (P <0.01).

\* Significant statistical differences (P <0.01) between columns denoting damage by freezing.

Como algunos autores (Zhu y Liu, 2000; Peris-Frau *et al.*, 2020) han postulado que el daño estructural y funcional de los dominios de membrana del espermatozoide pueden ocurrir de manera individual y no dependiente, en este ensayo, se realizaron pruebas de valoración estructural (NAR) y funcional (ORT) de la MA y de la MP (VIT y HOST-EN). Todo esto, buscando una prueba única que pudiese evaluar varios aspectos relacionados con calidad seminal y correlacionarlos con la fertilidad *in vivo* (Rubio-Guillén *et al.*, 2014b).

Dos condiciones hiposmóticas fueron utilizadas en este estudio (102 y 154 mOsm.L<sup>-1</sup>) en busca de diferencias en la resistencia a la anisomosis y con fines de detección de falsos negativos, ya que ha sido publicado que para ovinos son recomendables condiciones de hiposmolaridad más bajas que en los grandes rumiantes (Anel *et al.*, 2003). Sin embargo, en las condiciones en que se realizó este ensayo no se observaron diferencias estadísticas significativas ( $P > 0,001$ ) entre ambas condiciones para ninguno de los tres tratamientos. Conclusión fehaciente que permite el uso de ambas osmolaridades para observar la respuesta a la incubación hiposmótica, sin detrimento de la respuesta por aparición de falsos negativos. Por esta razón, en ovinos se sigue usando esta prueba hoy por hoy, como un fiel estimador de la integridad funcional de la MP, como lo demuestran algunos estudios (Valdez, 2013; García, 2014). En rumiantes, se han señalado correlaciones altas y positivas entre el HOST y el porcentaje de espermatozoides

of live sperm, sperm motility, the percentage of normal sperm, and *in vivo* and *in vitro* fertility, both for fresh semen and for thawed semen (Anel *et al.*, 2003; Rubio-Guillén, 2006).

## Conclusions

The seminal cryopreservation process alters the functionality of a large proportion of spermatozoa, the acrosome being the structural unit, which is mainly affected. The anysosmotic incubation demonstrated how the acrosome suffers considerably in structural and functional integrity (DAR and ORT), more than MP.

## Recommendations

Considering the biological and economic importance of knowing accurately the potential fertility of the ovine semen used in AI, it is recommended to evaluate the seminal samples obtained in this study, in field fertility (nulliparous females) or IVF to better assess sperm quality.

### End of English Version

vivos, la motilidad espermática, el porcentaje de espermatozoides normales y la fertilidad *in vivo* e *in vitro*, tanto del semen fresco, como para el descongelado (Anel *et al.*, 2003; Rubio-Guillén, 2006).

## Conclusiones

El proceso de criopreservación seminal altera la funcionalidad de una

gran proporción de espermatozoides, siendo el acrosoma la unidad estructural, que principalmente es afectada. La incubación anisomótica demostró como el acrosoma sufre considerablemente en integridad estructural y funcional (DAR y ORT), más que la MP.

## Recomendaciones

Considerando la importancia biológica y económica que implica conocer en forma certera la fertilidad potencial del semen ovino utilizado en la IA, se recomienda evaluar las muestras seminales obtenidas en este estudio, en fertilidad de campo (hembras nulíparas) o FIV para valorar mejor la calidad espermática.

## Literatura citada

- Anel, L., P. D. Paz, M. Álvarez, C. A. Chamorro, J. C. Boixo, A. Manso, M. González, M. Kaabi, M. and E. Anel. 2003. Field and *in vitro* assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology* 60: 1293-1308.
- Chan, P., D. R. Tredway, B. C. Su, J. Corselle and S. Ren. 1991. Combined supravital stains and hypoosmotic swelling test. *Human Reprod.* 6(8): 1115-1118.
- Chen, F., L., Gao, H., Zhou, L., Gou, Q., Chen, Y., Gan, X., Sun, Q., Li, and K., Wrang. 2019. The association between sperm head elongation and semen quality. *Andrology* 1-6.
- Córdova-Izquierdo, A., M. Córdova-Jiménez, C. Córdova-Jiménez y J. Guerra-Liera. 2008. Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras *Rev. Vet.* 19(1): 67-79.
- Dacheux, F., and J. Dacheux. 2001. L'épididyme et les glandes annexes. *In: La reproduction chez les mammifères et l'Homme*. Coordonateurs: Charles Thibault et Marieclaire Levasseur. Ellipses Édition Marketing, S.A. INRA. Paris, France. Chapitre 14: 455-468.
- Díaz, A. R., F. Martínez-Pastor, E. Anel, M. Álvarez, L. Anel, J. C. Boixo, J. D. Muro y P. de Paz. 2012. Variación de las técnicas de valoración acrosomal en distintas fases de la conservación de semen ovino. *Producción ovina y caprina N° XXVII SEOC*: 1012-1015.
- Dzuik, J. 1996. Factors that influence the proportion of offspring sired by a male following heterospermic insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 43: 277-282.
- Ewel, J., A. Madriz y A. Tosi. 1968. Zonas de vida de Venezuela. 2da. Edición. Editorial Sucre, Caracas. 65 p.
- Foot, R. H. and J. E. Parks. 1993. Factors affecting preservation and fertility of bull semen: A brief review. *Reprod. Fert. Dev.* 5: 665-673.
- García, W. 2014. Optimización de los protocolos de criopreservación de semen ovino de las razas autóctonas en peligro de extinción Xisqueta y Aranesa. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 315 p. <https://ddd.uab.cat/record/127501>
- Giraud, M., C. Motta, D. Boucher and G. Grizard. 2000. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Human Reproduction* 15(10): 2160-2164.
- Guillaume, M., O. Sabido, P. Durand and R. Levy. 2004. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol. Reprod.* 71: 28-37.
- González-Villalobos, D. 2017. Cinética del espermatozoide de cerdo y su utilidad como método de evaluación de la calidad seminal. Trabajo de Ascenso categoría de Profesor Titular. Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracaibo, Venezuela. 63 pp.
- Hammerstedt, R. H., J. K. Graham and J. P. Nolan. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* 11: 73-88.
- Hernández, P. J. E., R. F. Fernández, S. J. L. Rodríguez, R. E. Juárez, M. Y. G. Soto and R. A. D. García. 2012. Effect

- of cryopreservation of sheep semen related to its viability and acrosomal status. *Rev. Salud Anim.* 34(2): 78-83.
- Januskauskas, A. and H. Rodríguez-Martínez. 2000. Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen. *Acta Vet. Scand.* 36: 571-574.
- Jeyendran, R. S., H. H. Van der Ven, M. Pérez-Peláez, B. J. Crabo and L. J. Zaneveld. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70: 219-228.
- Jin, M., E. Fujiwara, Y. Kakiuchi, M. Okabed, Y. Satouh, S. Baba, K. Chiba and N. Hirohashia. 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during *in vitro* fertilization. *PNAS* 108(12): 4892-4896.
- Leahy T., J. I. Marti, N. Mendoza, R. Pérez-Pérez, T. Muino-Blanco, J. A. Cebrían-Pérez, G. Evans and W. M. C. Maxwell. 2010. High pre-freezing dilution improves post-thaw function of ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 119: 137-146.
- Nava-Trujillo, H., A. Quintero-Moreno, C. Osorio, J. Rubio-Guillén, F. Carrillo and G. Finol-Parra. 2012. Use of water test to assess the sperm membrane functional integrity in cryopreserved bull semen. *Rev. Cientif. FCV-LUZ.* Vol. XXI (3): 211-214.
- Peris-Frau, P., A., Soler, M., Iniesta, A., Martín, I., Sánchez, D. Medina, M., Fernández and O., García. 2020. Sperm cryodamage in ruminants: Understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. *Int. J. Mol. Sci.*: 21: 2781-2008.
- Pursel, V. G., L. A. Johnson. 1974. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology.* 1(2):63-68.
- Quintero-Moreno, A., T. Rigau, J. E. Rodríguez-Gil. 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analyses. *Theriogenology.* 61:673-690.
- Quintero, A., J. Rubio, T. Rigau y J. E. Rodríguez-Gil. 2005. El test de resistencia hiposmótica: un test promisorio para medir la integridad de la membrana espermática del cerdo. Maracaibo, Venezuela. *Arch. Lat. Prod. Anim.* 4 p.
- Quintero-Moreno A., J. Rubio-Guillén, D. González-Villalobos, J. C. Gutiérrez, N. Madrid-Bury, J. J. Garde. 2011. Identificación de cryodamage on plasma membrane Integrity in bull spermatozoa and its relationship with field fertility. *Revista Científica, FCV-LUZ XXI.* (5): 403-407.
- Rodríguez-Martínez, H. 2000. Evaluación de semen congelado: Métodos Tradicionales y de actualidad. *Internacional Veterinary Information Service (www. ivis.org)*, Ithaca, New Cork, USA.
- Rubio-Guillén, J. 2006. Efecto del proceso de criopreservación sobre la calidad seminal y fertilidad de toros Holstein, Brahman y sus mestizos. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. 103 p.
- Rubio-Guillén, J., D. González y A. Quintero-Moreno. 2009. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Rev. Cient. FCV-LUZ.* XIX (4): 382-389.
- Rubio-Guillén, J., O. Portillo-Guevara, M. Montero, A. Velásquez, W. Zalahne, D. González-Villalobos, P. Torres-Rodríguez, A. Quintero-Moreno. 2013. Integridad de la membrana plasmática de espermatozoides recién colectados de ovinos en condiciones de trópico seco. *XV Jornadas sobre Producción Animal. AIDA. Tomo I:* 407-409.
- Rubio-Guillén, J., C. Osorio y L. Yamarte. 2014a. Innovadora prueba de valoración seminal ovina utilizando tres (3) test de fácil aplicación en campo. 3er Congreso Venezolano de Ciencia, tecnología e innovación. Del 27-29/11/14. Caracas, Venezuela.
- Rubio-Guillén, J., A. Quintero-Moreno, D. González y C. Osorio. 2014b. Integridad estructural y funcional de la membrana plasmática de

- espermatozoides recién colectados de ovinos tropicales. II Encuentro Andino de Ciencia, Tecnología e innovación. Del 22-24/10/14. Mérida, Venezuela.
- Rubio-Guillén, J., M. Montero, O. Portillo, D. González, J. Aranguren-Méndez, N. Madrid-Bury, Y. Villasmil y A. Quintero-Moreno. 2012. Comparación entre dos grupos raciales de ovinos tropicales mediante pruebas de viabilidad espermática. XIII Jornadas Científico Técnicas de la Facultad de Agronomía LUZ. 21-23/11/12. Maracaibo, Venezuela. 55 p.
- Rubio-Guillén, 2017. Efecto de la criopreservación sobre la integridad estructural y funcional de espermatozoides ovinos tropicales. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia. 137 p.
- SAS Institute. 2000. SAS user guide: statics. Versión 8.0 Edition SAS institute Inc. Cary, NY. 530 p.
- Schilling, E. and M. Vengust. 1985. Determination of osmotic resistance of boar spermatozoa and its relationship with the storage ability of semen samples. *Zuchthygiene* 20: 61-78.
- Tesarik, J., C. Mendoza, J. P. Ramirez, J. Moos. 1993. Solubilized human zona pellucida competes with a fucosylated neoglycoprotein for binding sites on the human sperm surface. *Fertility & Sterility*. 60(2): 344-350.
- Utt, M. 2015 Prediction of bull fertility. *Anim. Reprod. Sci.* Available in: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.12.011>
- Valdez, D. 2013. Efecto del dodecil sulfato iónico adicionado a un diluyente libre de yema de huevo sobre la calidad del semen congelado ovino. Tesis de Maestría. Universidad de Cuenca. Ecuador. 74 p. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/500>.
- Vargas, P. 2015. Efecto del factor dilutor y raza en la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen crioconservado de carneros. Tesis de Grado a Médico Veterinario. Universidad Nacional del Altiplano. 81 p. Disponible en: <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/2236>.
- Varisli O., C. Uguz, C. Agca and Y. Agca. 2009. Motility and acrosomal integrity comparisons between electro-ejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a range of anisomotic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. *Anim. Reprod. Sci.* 110: 256-268.
- Vera-Muñoz, O. 2001. Evaluación seminal comparativa pre y postcongelación en machos bovinos. En: *Reproducción bovina*. González-Stagnaro C. (Ed.). Edics. Astro Data S.A. Fundación GIRARZ. Maracaibo-Venezuela. Cap: XII: 1-11.
- Vera-Muñoz, O., 2008. Fisiología de los espermatozoides bovinos. En: *Desarrollo sostenible de ganadería doble propósito*. Gonzalez-Stagnaro C., E. Soto-Belloso (Eds.). Fundación GIRARZ. Ediciones ASTRODA S.A. Sección 5(40): 495-504.
- Villasmil, Y., J. Aranguren, N. Madrid-Bury, D. González, J. Rubio-Guillén, C. González-Stagnaro, M. Portillo y F. Yañez. 2011. Edad y peso a la pubertad de ovinos cruzados en el Estado Zulia, Venezuela. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA*. 419-422.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. *In: Physiology of reproduction*. Knobil, E. and J.D. Neill (Eds.). 2nd edition. Raven Press, New York. p. 189-317.
- Yániz, J. L., C. Soler, P. Recreo, T. Carretero and A. Bono. 2015. Sperm population structure in high and low field fertility rams. *Anim. Reprod. Sci.* 156: 128-134.
- Zhu, W. and X. Liu. 2000. Cryodamage to plasma integrity in head and tail region human sperm. *Asian J. Androl.* 2: 135-138.








## Respuesta bioquímica e inmune en tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*) con suplementación de quitosano en dieta

Biochemical and immune response in red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*) with dietary chitosan supplementation

Resposta bioquímica e imune em tilápia vermelha (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*) com suplementação de quitosana na dieta

Yuniel Méndez-Martínez<sup>1\*</sup>, Ginger K. Pacheco-Morales<sup>1</sup>,  
Karla A. Del Barco-Ibarra<sup>1</sup>, Yenny G. Torres-Navarrete<sup>1</sup> y  
Martha P. Hernández-Vergara<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), Quevedo, Los Ríos, Ecuador. Correos electrónicos: (YM) [ymendezm@uteq.edu.ec](mailto:ymendezm@uteq.edu.ec), , (GP) [ginger.pacheco2014@uteq.edu.ec](mailto:ginger.pacheco2014@uteq.edu.ec), , (KD) [karla.delbarco2014@uteq.edu.ec](mailto:karla.delbarco2014@uteq.edu.ec), , (YT) [ytorres@uteq.edu.ec](mailto:ytorres@uteq.edu.ec), ; <sup>2</sup>División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Boca del Río, Boca del Río, Veracruz, México. Correos electrónicos: (MH) [mphv1@yahoo.com.mx](mailto:mphv1@yahoo.com.mx), .

### Resumen

El uso de bioestimulantes en dietas para peces es una estrategia prometedora para reducir el uso de antibióticos, potenciar la respuesta bioquímica e inmune, lo cual contribuye a mejorar rendimientos productivos y disminuir las pérdidas económicas. Se evaluó la respuesta bioquímica e inmune en juveniles de tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*), con diferentes niveles: 0 (control), 1, 2, 3, 4 y 5 % de quitosano en dieta. Se sembraron 270 animales ( $7,53 \pm 0,50$  g de peso inicial), distribuidos en un diseño completamente al azar de 6 tratamientos con 3 réplicas y 45 tilapias.tratamiento<sup>1</sup>, en 18 tanques con 90 L de agua en sistema cerrado. Los juveniles se alimentaron durante 55 días con las dietas experimentales y al final del bioensayo se tomaron las muestras de tejidos y plasma sanguíneo. Se encontraron diferencias ( $p < 0,05$ ) en las variables respuestas evaluadas, donde

Recibido: 19-11-2020 • Aceptado: 09-03-2021.

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [ymendezm@uteq.edu.ec](mailto:ymendezm@uteq.edu.ec)

el contenido de lípidos, triglicéridos, colesterol, hidratos de carbono y glucosa mostraron mayores niveles ( $p < 0,05$ ) a concentraciones de quitosano más bajas. Sin embargo, para contenidos de proteínas se encontró mejor respuesta ( $p < 0,05$ ) a mayores niveles de quitosano en dieta. Con respecto a la materia seca y ceniza no se encontró diferencias ( $p < 0,05$ ). Mientras que la superóxido dismutasa y los leucocitos se encontraron en mayor concentración ( $p < 0,05$ ) cuando se suplementa con quitosano en un 3 y 4 %. Se concluyó que la respuesta bioquímica e inmune de juveniles de tilapia roja se favoreció con la suplementación de quitosano en dieta. **Palabras claves:** glucosa, inmunoestimulantes, leucocitos, proteínas, superóxido dismutasa, triglicéridos.

### Abstract

The use of biostimulants in fish diets is a promising strategy to reduce the use of antibiotics, enhance the biochemical and immune response, which contributes to improving productive yields and reducing economic losses. The biochemical and immune response was evaluated in juvenile red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*), with different levels: 0 (control), 1, 2, 3, 4 and 5% chitosan in diet. 270 animals ( $7.53 \pm 0.50$  g of initial weight), distributed in a completely randomized design of 6 treatments with 3 replicates and 45 tilapia.treatment<sup>-1</sup>, were sown in 18 tanks with 90 L of water in a closed system. The juveniles were fed for 55 days with the experimental diets and at the end of the bioassay the tissue and blood plasma samples were taken. Differences were found ( $p < 0.05$ ) in the variables evaluated responses, where the content of lipids, triglycerides, cholesterol, carbohydrates and glucose showed higher levels ( $p < 0.05$ ) at lower chitosan concentrations. However, for protein content, a better response ( $p < 0.05$ ) was found at higher levels of chitosan in the diet. Regarding dry matter and ash, no differences were found ( $p < 0.05$ ). While superoxide dismutase and leukocytes were found in higher concentration ( $p < 0.05$ ) when supplemented with chitosan by 3 and 4%. It was concluded that the juvenile biochemical and immune response of red tilapia was favored with dietary chitosan supplementation.

**Keywords:** glucose, immunostimulant, leukocytes, protein, superoxide dismutase, triglycerides.

### Resumo

O uso de bioestimulantes na dieta de peixes é uma estratégia promissora para reduzir o uso de antibióticos, potencializar a resposta bioquímica e imunológica, o que contribui para melhorar os rendimentos produtivos e reduzir as perdas econômicas. A resposta bioquímica e imune foi avaliada em juvenis de tilápia vermelha (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*), com diferentes níveis: 0 (controle), 1, 2, 3, 4 e 5% de quitosana na dieta. 270 animais ( $7,53 \pm 0,50$  g de peso inicial), distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado de 6 tratamentos com 3 repetições e 45 tilápias.tratamento<sup>-1</sup>, foram semeados em 18

tanques com 90 L de água em sistema fechado. Os juvenis foram alimentados por 55 dias com as dietas experimentais e ao final do bioensaio foram coletadas amostras de tecido e plasma sanguíneo. Foram encontradas diferenças ( $p < 0,05$ ) nas variáveis de resposta avaliadas, onde os teores de lipídios, triglicerídeos, colesterol, carboidratos e glicose apresentaram níveis mais elevados ( $p < 0,05$ ) nas menores concentrações de quitosana. No entanto, para o teor de proteína, uma melhor resposta ( $p < 0,05$ ) foi encontrada em níveis mais elevados de quitosana na dieta. Em relação à matéria seca e cinzas, não foram encontradas diferenças ( $p < 0,05$ ). Já a superóxido dismutase e os leucócitos foram encontrados em maior concentração ( $p < 0,05$ ) quando suplementados com quitosana a 3 e 4%. Concluiu-se que a resposta bioquímica e imune juvenil da tilápia vermelha foi favorecida com a suplementação de quitosana na dieta.

**Palavras-chave:** glicose, imunoestimulante, leucócitos, proteína, superóxido dismutase, triglicerídeos.

## Introducción

La acuicultura creció de manera exponencial en los últimos 50 años, partiendo de una producción de menos de 1 millón de toneladas (t) en 1950 a más de 90 millones t a nivel mundial en los últimos años (FAO, 2020). Uno de los principales factores que incide en el éxito de esta industria es la selección de especies con alto potencial productivo, las cuales son ricas en proteínas y variedad de ácidos grasos insaturados (Jim *et al.*, 2017), tal es el caso de la tilapia roja, de la cual existen híbridos como *Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus* (Méndez-Martínez *et al.*, 2019).

En Ecuador, la tilapia roja se introdujo en 1993, y es la segunda especie de importancia en la acuicultura después del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), donde el cultivo comercial nace a partir de la aparición del virus de la mancha blanca que afectó la producción camaronera, dejando infraestructuras disponibles.

## Introduction

Aquaculture has grown exponentially in the last 50 years, from a production of less than 1 million tons (t) in 1950 to more than 90 million tons worldwide in recent years (FAO, 2020). One of the main factors that affects the success of this industry is the selection of species with high productive potential, which are rich in proteins and a variety of unsaturated fatty acids (Jim *et al.*, 2017), such is the case of red tilapia, of which there are hybrids such as *Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus* (Méndez-Martínez *et al.*, 2019).

In Ecuador, red tilapia was introduced in 1993, and is the second most important species in aquaculture after white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), where the commercial culture was born from the appearance of the white spot virus that affected production. shrimp farm, leaving infrastructures available.

En la actualidad, la tilapia se cultiva en sistemas intensivos y semintensivos donde los requerimientos nutricionales son satisfechos con dietas artificiales; pero debido a las condiciones de cultivo como las altas densidades de siembra y limitada calidad de agua, promueve que los organismos se encuentran sujetos a estrés constante que se traduce en bajas tasas de crecimiento, ineficiencia alimenticia y bajas supervivencias (Lara-Flores *et al.*, 2003; Al-Sagheer *et al.*, 2018), lo cual a su vez ha provocado brotes de patógenos e infecciones que conllevan daño sustancial al rendimiento (Brum *et al.*, 2017). Se encontró que el estrés oxidativo en los peces puede producir leucopenia y cambios en la fórmula leucocitaria (Biller y Takahashi, 2018), además de efectos en células y tejidos de mutagénesis y carcinogénesis (Malachy *et al.*, 2017).

Entre los factores limitantes de las producciones acuícolas está la carencia de herramientas inmunoterapéuticas profilácticas que reduzcan el efecto de enfermedades en los diferentes cultivos (Kumari y Sahoo, 2006, Brum *et al.*, 2017), que favorezcan no solo las funciones del sistema inmunológico, sino también los factores metabólicos, tasa de crecimiento (Heo *et al.*, 2001; Fadl *et al.*, 2020) y sean amigables con el medio ambiente.

Los inmunoestimulantes pueden activar respuestas inmunes no específicas y/o específicas, donde los mecanismos de defensa incluyen procesos metabólicos antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos cuyas funciones pueden depender de cantidades óptimas

At present, tilapia is cultivated in intensive and semi-intensive systems where nutritional requirements are satisfied with artificial diets; but due to the cultivation conditions such as high planting densities and limited water quality, it promotes that organisms are subject to constant stress that translates into low growth rates, nutritional inefficiency and low survival rates (Lara-Flores *et al.*, 2003; Al-Sagheer *et al.*, 2018), which in turn has caused outbreaks of pathogens and infections that lead to substantial damage to yield (Brum *et al.*, 2017). It was found that oxidative stress in fish can produce leukopenia and changes in the leukocyte formula (Biller and Takahashi, 2018), as well as effects on cells and tissues of mutagenesis and carcinogenesis (Malachy *et al.*, 2017).

Among the limiting factors of aquaculture productions is the lack of prophylactic immunotherapeutic tools that reduce the effect of diseases in different crops (Kumari and Sahoo, 2006, Brum *et al.*, 2017), which favor not only the functions of the immune system, but also metabolic factors, growth rate (Heo *et al.*, 2001; Fadl *et al.*, 2020) and are friendly to the environment.

Immunostimulants can activate non-specific and/or specific immune responses, where defense mechanisms include non-enzymatic and enzymatic antioxidant metabolic processes whose functions may depend on optimal amounts of immunostimulants to express these types of responses against stressful conditions or the presence of pathogens (Mehana *et al.*, 2015;

de inmunoestimulantes para expresar este tipo de respuestas contra condiciones estresantes o presencia de patógenos (Mehana *et al.*, 2015; Abdel-Ghany y Salem, 2019). Además de considerarse una estrategia prometedora para reducir el uso de antibióticos y productos quimioterapéuticos, potenciar la respuesta productiva y disminuir las pérdidas económicas (Lara-Flores *et al.*, 2003; Al-Sagheer *et al.*, 2018).

En este sentido, el quitosano se ha convertido en candidato, dado que es polisacárido alcalino natural (β-1,4-N-acetilglucosamina) con cargas positivas más abundantes (Alishahi and Aider, 2012; Ngo y Kim, 2014; Abdel-Ghany y Salem, 2019); biodegradable no tóxico, que contiene grupos amino e hidroxilo y tiene diversas propiedades: hemostática, antiinflamatorio, actividad antitumoral, actividad antimicrobiana, actividad hipoglucémica e hipo colesterol y un efecto estimulador catabólico y anabólico (Pérez *et al.*, 2014; Mahmoud *et al.*, 2017; Udo *et al.*, 2018).

Se documentó la actividad bioestimuladora del quitosano en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Sakai *et al.*, 1992), dorada (*Sparus aurata*) (Esteban *et al.*, 2001), lubina juvenil (*Dicentrarchus labrax*) (Zaki *et al.*, 2015), *Labeo rohita* (Mastan, 2015), y bagre africano (*Clarias gariepinus*) (Udo *et al.*, 2018). Sin embargo, el efecto del quitosano en la dieta sobre aspectos bioquímicos e inmunes en tilapia no ha recibido mucha atención. La presente propuesta se desarrolló para evaluar la respuesta bioquímica e inmune en juveniles de tilapia roja

Abdel-Ghany and Salem, 2019). In addition to being considered a promising strategy to reduce the use of antibiotics and chemotherapeutic products, enhance the productive response and reduce economic losses (Lara-Flores *et al.*, 2003; Al-Sagheer *et al.*, 2018).

In this sense, chitosan has become a candidate, since it is a natural alkaline polysaccharide (β-1,4-N-acetylglucosamine) with more abundant positive charges (Alishahi and Aider, 2012; Ngo and Kim, 2014; Abdel-Ghany and Salem, 2019); non-toxic, biodegradable, containing amino and hydroxyl groups and has various properties: hemostatic, anti-inflammatory, antitumor activity, antimicrobial activity, hypoglycemic and hypo-cholesterol activity, and a catabolic and anabolic stimulatory effect (Pérez *et al.*, 2014; Mahmoud *et al.*, 2017; Udo *et al.*, 2018).

The biostimulatory activity of chitosan was documented in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Sakai *et al.*, 1992), sea bream (*Sparus aurata*) (Esteban *et al.*, 2001), juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Zaki *et al.*, 2015), *Labeo rohita* (Mastan, 2015), and African catfish (*Clarias gariepinus*) (Udo *et al.*, 2018). However, the effect of dietary chitosan on biochemical and immune aspects in tilapia has not received much attention. The present proposal was developed to evaluate the biochemical and immune response in juvenile red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*), with the supplementation of different levels of chitosan in the diet.

(*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*), con la suplementación de diferentes niveles de quitosano en la dieta.

## Materiales y métodos

### Formulación y elaboración de dietas experimentales

En el presente estudio, todas las dietas (cuadro 1) se formularon (LINDO Systems, Inc. IL, USA), y la suplementación de diferentes niveles de quitosano: 0 (control), 1, 2, 3, 4 y 5 %, para un total de 6 tratamientos. Todos los ingredientes se tamizaron con un tamiz de malla de 250 µm y se pesaron con una balanza digital (0,01 g; PE 3600 Mettler-Toledo, OH, USA). Para cada dieta se mezclaron todos los macroingredientes en una mezcladora industrial (Hobart 20 Qt-A200, OH, USA) hasta obtener una mezcla uniforme. Los microingredientes se mezclaron en un recipiente plástico antes de agregarlos a la mezcla. La lecitina de soja y aceite de pescado se mezclaron hasta obtener una mezcla homogénea y luego se agregó agua con un equivalente al 30 % por peso de los ingredientes. El alimento fue pelletizado con una picadora de carne (Tor-Rey MJ22 JR, N L, MX) para obtener gránulos de 2 mm, que luego se secaron durante 8 h a 45 °C en un horno de flujo de aire (Hafó Serie 1600, Sheldon Manufacturing Cornelius, OR), luego los pellets secos se envasaron en bolsas plásticas y se mantuvieron a -4 °C hasta su uso (Méndez-Martínez *et al.*, 2019, 2021).

## Materials and methods

### Formulation and elaboration of experimental diets

In the present study, all the diets (Table 1) were formulated (LINDO Systems, Inc. IL, USA), and the supplementation of different levels of chitosan: 0 (control), 1, 2, 3, 4 and 5 %, for a total of 6 treatments. All ingredients were sieved with a 250 µm mesh sieve and weighed with a digital scale (0.01 g; PE 3600 Mettler-Toledo, OH, USA). For each diet, all the macro ingredients were mixed in an industrial mixer (Hobart 20 Qt-A200, OH, USA) until a uniform mixture was obtained. The micro-ingredients were mixed in a plastic container before adding to the mix. The soy lecithin and fish oil were mixed until a homogeneous mixture was obtained and then water was added with an equivalent of 30 % by weight of the ingredients. The food was pelleted with a meat grinder (Tor-Rey MJ22 JR, NL, MX) to obtain 2 mm granules, which were then dried for 8 h at 45 °C in an air flow oven (Hafó 1600 Series, Sheldon Manufacturing Cornelius, OR), then the dry pellets were packed in plastic bags and kept at -4 °C until use (Méndez-Martínez *et al.*, 2019, 2021).

### Fish culture conditions

Red tilapia juveniles (7.53 ± 0.50g) were obtained from the Fish Culture Program and transferred to the Aquaculture Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences (01°03'18"S, 79°25'24"W) of the Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), respectively. For a

**Cuadro 1. Formulación y composición química de dietas experimentales con suplementación de quitosano.**

**Table 1. Formulation and chemical composition of experimental diets with chitosan supplementation.**

Ingredientes	Niveles de quitosano en dietas (%)					
	0	1	2	3	4	5
Harina de pescado <sup>1</sup>	46,50	46,50	46,50	46,50	46,50	47,00
Pasta de soya <sup>2</sup>	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00
Harina de trigo <sup>3</sup>	13,90	13,90	13,90	13,40	12,90	11,90
Harina de maíz <sup>3</sup>	4,00	3,00	2,00	1,50	1,00	0,50
Quitosano <sup>4</sup>	0,00	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00
Lecitina de Soya <sup>3</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Aceite de pescado <sup>5</sup>	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Alginato de sodio <sup>6</sup>	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Premezclas minerales <sup>3*</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Premezclas vitamínicas <sup>3**</sup>	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Vitamina C <sup>3</sup>	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Composición proximal real (% Materia Seca)						
Materia seca	94,68	93,77	94,02	94,28	93,80	93,99
Ceniza	8,20	9,30	10,10	10,22	12,01	9,80
Grasa	7,15	7,24	8,01	7,84	7,18	8,02
Proteína	32,07	32,22	32,47	32,30	32,22	32,17
Fibra	5,63	5,86	5,92	6,18	6,66	6,81
E. L. N. N <sup>†</sup>	18,38	18,18	18,22	18,11	17,57	18,10
Energía bruta (kJ.g <sup>-1</sup> ) <sup>‡</sup>	46,95	45,38	43,50	43,46	41,93	43,20

<sup>1</sup>Comercial El Gordillo, Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. <sup>2</sup> Valencia- Avícola, Valencia, Ecuador. <sup>3</sup>Supermaxi, Quevedo, Ecuador, <sup>4</sup>Exspectrocrom, Guayaquil, Ecuador. <sup>5</sup> Productos Pesqueros S.A, Manta, Ecuador. <sup>6</sup> Suministros AZ, La Paz, México. \*mg.kg<sup>-1</sup>: Sulfato de magnesio 5,1; Cloruro de sodio 2,4; Cloruro de potasio 2; Sulfato ferroso 1; Sulfato de zinc 0,2; Sulfato cúprico 0,0314; Sulfato manganoso 0,1015; Sulfato de cobalto 0,0191; Yodato de calcio 0,0118; Cloruro de cloro 0,051. \*\*mg.kg<sup>-1</sup>: Tiamina 60; Rivo flavina 25; Niacina 40; Vitamina B6 50; Ácido pantoténico 75; Biotina 1; Folato 10; Vitamina B12 0,2; Hill 600; Myoinositol 400; Vitamina C 200; Vitamina A 5000 UI; Vitamina E 100; Vitamina D 0,1; Vitamina K 5. <sup>†</sup>Extracto libre de nitrógeno = 100 - (% proteína bruta +% extracto etéreo +% fibra bruta +% ceniza). <sup>‡</sup>Se calculó con los coeficientes calóricos: 23,4 kJ.g<sup>-1</sup>, 39,2 kJ.g<sup>-1</sup>, 17,2 kJ.g<sup>-1</sup> de proteína, grasas y carbohidratos, respectivamente (Goddard, 1996).

<sup>1</sup>Comercial El Gordillo, Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. <sup>2</sup>Valencia- Avícola, Valencia, Ecuador. <sup>3</sup>Supermaxi, Quevedo, Ecuador, <sup>4</sup>Exspectrocrom, Guayaquil, Ecuador. <sup>5</sup>Productos Pesqueros S.A, Manta, Ecuador. <sup>6</sup>Suministros AZ, La Paz, México. \*mg.kg<sup>-1</sup>: Magnesium sulfate 5.1; Sodium chloride 2.4; Potassium chloride 2; Ferrous sulfate 1; Zinc sulfate 0.2; Cupric sulfate 0.0314; Manganous sulfate 0.1015; Cobalt sulfate 0.0191; Calcium iodate 0,0118; Chlorine chloride 0.051. \*\*mg.kg<sup>-1</sup>: Thiamine 60; Rivo flavin 25; Niacin 40; Vitamin B6 50; Pantothenic acid 75; Biotin 1; Folate 10; Vitamin B12 0.2; Hill 600; Myoinositol 400; Vitamin A 5000 UI; Vitamin E 100; Vitamin D 0.1; Vitamin K 5. <sup>†</sup>Nitrogen-free extract = 100 - (% crude protein +% ethereal extract +% crude fiber +% ash). <sup>‡</sup>It was calculated with the caloric coefficients: 23.4 kJ.g<sup>-1</sup>, 39.2 kJ.g<sup>-1</sup>, 17.2 kJ.g<sup>-1</sup> of protein, fat and carbohydrates, respectively (Goddard, 1996).

### Condiciones de cultivo de los peces

Los juveniles de tilapia roja ( $7,53 \pm 0,50g$ ) se obtuvieron del Programa de Cultivo de Peces y se trasladaron al Laboratorio de Acuicultura de la Facultad de Ciencias Agropecuarias ( $01^{\circ}03'18''S, 79^{\circ}25'24''W$ ) de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), respectivamente. Durante una semana se aclimataron y desparasitaron (API Stress Zyme, OH, USA). Los organismos se colocaron aleatoriamente en 18 tanques a una densidad de 15 peces/tanque de 90 L agua, para un total de 270 peces. Se alimentaron con las seis dietas experimentales, *ad libitum* durante 55 días.

Se realizó el control de los parámetros físico-químicos del agua, la temperatura se midió con un termómetro de mercurio (0 a 50 °C), el oxígeno disuelto con un oxímetro digital (55-DO, YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, USA), y el pH,  $NH_4$ ,  $NO_2$  y  $NO_3$  con el kit colorimétrico (Saltwater Master Test, OH, USA), respectivamente. Todos los tanques se sifonearon diariamente en las mañanas antes de alimentar, para retirar las heces y alimento sobrante y el agua (30% aproximadamente) que se extraía durante el sifoneo era reemplazada.

### Obtención de muestras: sangre y tejido muscular

Al final del periodo de cultivo se dejaron en ayuno 14 h antes de tomar las muestras, para ello los juveniles se anestesiaron con una solución de eugenol: alcohol (relación 1:3 mL en 10 L de agua), durante 2 min. Las

week they acclimatized and dewormed (API Stress Zyme, OH, USA). The organisms were randomly placed in 18 tanks at a density of 15 fish/90 L water tank, for a total of 270 fish. They were fed the six experimental diets *ad libitum* for 55 days.

The control of the physical-chemical parameters of the water was carried out, the temperature was measured with a mercury thermometer (0 to 50 °C), the dissolved oxygen with a digital oximeter (55-DO, YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, USA), and the pH,  $NH_4$ ,  $NO_2$  and  $NO_3$  with the colorimetric kit (Saltwater Master Test, OH, USA), respectively. All tanks were siphoned daily in the morning before feeding, to remove the feces and excess food and the water (approximately 30 %) that was extracted during the siphoning was replaced.

### Sampling: blood and muscle tissue

At the end of the culture period, they were fasted for 14 h before taking the samples, for this the juveniles were anesthetized with a eugenol:alcohol solution (ratio 1:3 mL in 10 L of water), for 2 min. Blood samples were obtained as indicated by Azizoglu and Cengizler (1996), by caudal venipuncture with 3 mL disposable syringes and deposited in vacutainer tubes (Vacuette, Laborgeräte GmbH, Eschau, DE) and capillary tubes (Isolab, Laborgeräte GmbH, Eschau, DE) with heparinized inner surfaces, and they were kept refrigerated at 4 °C for 24 h. They were then centrifuged (Gemmy, PLC-05, Taipei, TW) at 1200 rpm for 10 min to separate the plasma



muestras de sangre se obtuvieron según lo indicado por Azizoglu y Cengizler (1996), por venopunción caudal con jeringas desechables de 3 mL y depositada en tubos vacuénier (Vacuette, Laborgeräte GmbH, Eschau, DE) y tubos capilares (Isolab, Laborgeräte GmbH, Eschau, DE) con superficie interior heparinizados, y se conservaron en refrigeración a 4 °C por 24 h. Luego se centrifugaron (Gemmy, PLC-05, Taipei, TW) a 1200 rpm durante 10 min para separar el plasma de los elementos formes. El tejido muscular se disectó y conservó en bolsas de plástico por separado y se almacenaron a -40 °C hasta su análisis químico (Azaza *et al.*, 2009). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

#### Indicadores evaluados

Para el análisis de composición química (materia seca, proteínas, lípidos, carbohidratos y ceniza) del tejido muscular y las dietas se utilizaron los métodos descritos por la AOAC (2019). La evaluación de glucosa (Trinder, 1969), colesterol y triglicéridos (Schettler y Nussel, 1975) en plasma fue con reactivos kit (Human liquicolor, Wiesbaden, DE) para cada variable respectivamente. Luego se incubaron a una temperatura de 37 °C durante 25 min en baño María. Las reacciones colorimétricas cambiaron de acuerdo a la variable, para colesterol y triglicéridos fueron pruebas con factor aclarante de lípidos y para glucosa fue a través del método de desproteinización. Luego se llevaron al espectrofotómetro (SunostIk, SBA-733 Plus, Kunshan Road, CHN) para determinar la lectura de absorbancia a 500 nm, respectivamente.

from the formed elements. Muscle tissue was dissected and preserved in separate plastic bags and stored at -40 °C until chemical analysis (Azaza *et al.*, 2009). All analyzes were carried out in triplicate.

#### Evaluated indicators

For the analysis of chemical composition (dry matter, proteins, lipids, carbohydrates and ash) of muscle tissue and diets, the methods described by the AOAC (2019) were used. The evaluation of glucose (Trinder, 1969), cholesterol and triglycerides (Schettler and Nussel, 1975) in plasma was with kit reagents (Human liquicolor, Wiesbaden, DE) for each variable respectively. Then they were incubated at a temperature of 37 °C for 25 min in a water bath. The colorimetric reactions changed according to the variable, for cholesterol and triglycerides they were tests with lipid lightening factor and for glucose it was through the deproteinization method. They were then taken to the spectrophotometer (SunostIk, SBA-733 Plus, Kunshan Road, CHN) to determine the absorbance reading at 500 nm, respectively.

To determine the enzyme superoxide dismutase, the erythrocytes were washed 4 times with 3.0 mL of 0.9% NaCl solution, centrifuging for 10 min at 3000 rpm after each wash. A Kit (Ransel, Randox, Crumlin, Antrim, UK) was used, based on the methodology of McCord and Fridovich (1969), with a principle in the oxidation of glutathione (GSH) by cumene hydroperoxide catalyzed by GPx; in the presence of glutathione reductase (GR) and NADPH; the

Para determinar la enzima superóxido dismutasa se lavaron los eritrocitos 4 veces con 3,0 mL de solución de NaCl al 0,9 %, centrifugando durante 10 min a 3000 rpm después de cada lavado. Se empleó un Kit (Ransel, Randox, Crumlin, Antrim, UK), basado en metodología de McCord y Fridovich (1969), con principio en la oxidación de glutatión (GSH) por el hidroperóxido de cumeno catalizado por la GPx; en presencia de glutatión reductasa (GR) y NADPH; la lectura de absorbancia se realizó a 340nm. Se realizó el recuento total de leucocitos en cámara de Neubauer de 0,0025 mm<sup>2</sup> (Optic Labor, DE) (Hrubec y Smith, 2010).

### Análisis estadísticos

A los datos se aplicaron las pruebas de Kolmogorov - Smirnov (P<0,05) y Bartlett (P<0,05) previamente al análisis de varianza (ANOVA), cuando se observó valores significativos de F, se utilizó la prueba de rangos múltiples de LSD de Fisher (P<0,05). Se aplicó el software Minitab 18 (Minitab Inc., Philadelphia, PA, USA). Todos los datos porcentuales se transformaron por medio de log<sub>10</sub> para normalizar su distribución, antes de los estadísticos.

### Resultados y discusión

Los parámetros de calidad del agua fueron los siguientes: temperatura entre 25,0 – 26,0 °C, O<sub>2</sub> de 4,06 – 5,0 mg.L<sup>-1</sup>, pH de 7 – 8, NH<sub>4</sub> de 0,05 – 0,08 mg.L<sup>-1</sup>, NO<sub>2</sub> de 0,50 – 1,0 mg.L<sup>-1</sup> y NO<sub>3</sub> de 20 – 40 mg.L<sup>-1</sup>. Estos valores se encuentran dentro de los

absorbance reading was made at 340 um. The total leukocyte count was performed in a Neubauer chamber of 0.0025 mm<sup>2</sup> (Optic Labor, DE) (Hrubec and Smith, 2010).

### Statistical analysis

The Kolmogorov - Smirnov (P <0.05) and Bartlett (P <0.05) tests were applied to the data prior to the analysis of variance (ANOVA), when significant values of F were observed, the rank test was used Fisher's LSD multiples (P <0.05). Minitab 18 software (Minitab Inc., Philadelphia, PA, USA) was applied. All percentage data were transformed by means of log<sub>10</sub> to normalize their distribution, before the statistics.

### Results and discussion

The water quality parameters were the following: temperature between 25.0 - 26.0 °C, O<sub>2</sub> of 4.06 - 5.0 mg.L<sup>-1</sup>, pH of 7 - 8, NH<sub>4</sub> of 0.05 - 0.08 mg.L<sup>-1</sup>, NO<sub>2</sub> from 0.50 - 1.0 mg.L<sup>-1</sup> and NO<sub>3</sub> from 20 - 40 mg.L<sup>-1</sup>. These values are within the regular limits for production under controlled conditions of tilapia (Azaza *et al.*, 2009; Méndez-Martínez *et al.*, 2019), so it is assumed that the variations in the results were due to the treatments.

Muscle tissue protein showed the highest values (75.77, 71.42 and 74.50 % protein), (p <0.05) when they were fed diets containing chitosan levels of 2, 4 and 5 %, respectively. In this sense, Fadl *et al.* (2020), found an increase in protein in Nile tilapia with chitosan supplementation (5 %) in the

límites regulares para producción en condiciones controladas de tilapia (Azaza *et al.*, 2009; Méndez-Martínez *et al.*, 2019), por lo que se supone que las variaciones en los resultados se debieron a los tratamientos.

En el cuadro 2, se muestra la composición química del tejido muscular, la cual difirió significativamente ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos para proteína, hidratos de carbono y lípidos. Por otro lado, para materia seca y cenizas que resultaron similares, aunque los valores más bajos se encontraron en el tratamiento control.

diet and associated it with high serum proteins (albumin and globulin). Proteins, both cellular and plasma, are part of a general deposit of products in circulation for the maintenance of the physiological processes of the organism.

The highest content of carbohydrates in muscle tissue was found with chitosan levels of 0 and 1 %, which corresponded to the glucose levels (table 3) that decreased ( $p < 0.05$ ) to higher levels of chitosan, which is a sensitive indicator to physiological changes and immune response capacity. Low

**Cuadro 2. Composición química del músculo en juveniles de tilapia roja en base seca con suplementación de quitosano en dieta.**

**Table 2. Chemical composition of muscle in red tilapia juveniles on a dry basis with dietary chitosan supplementation.**

Variables (%)	Niveles de Quitosano en Dietas (%)						EE	p
	0	1	2	3	4	5		
Materia Seca	17,79	18,82	18,84	21,26	20,01	20,86	0,730	0,078
Proteínas	55,77c	42,92d	75,77a	70,58b	71,42ab	74,50a	4,688	0,002
Lípidos	5,08ab	4,43b	6,72a	4,34b	3,51c	3,71c	1,073	0,014
Hidratos de Carbono	35,02a	47,12a	14,01b	18,83c	17,87c	17,42c	3,771	0,001
Ceniza	4,14	5,78	4,92	5,81	5,09	5,10	0,324	0,536

abcd Letras diferentes dentro de la misma fila, difieren para  $p < 0,05$ . EE: Error Estándar.

a, b, c, d Different letters within the same row, differ for  $p < 0.05$ . EE: Standard Error.

La proteína del tejido muscular mostró los valores más altos (75,77, 71,42 y 74,50 % de proteína), ( $p < 0,05$ ) cuando se alimentaron con dietas que contenían niveles de quitosano de 2, 4 y 5%, respectivamente. En este sentido Fadl *et al.* (2020), encontraron aumento de proteína en la tilapia del Nilo con la suplementación de

plasma glucose levels may indicate low stress and better metabolic efficiency (Li *et al.*, 2018). It should be noted that it was not determined in this work if the increase in carbohydrates is structural or energetic, since the method to determine them did not allow to establish this difference.

quitosano (5%) en la dieta y lo asocio con proteínas séricas altas (albumina y globulina). Las proteínas, tanto celulares, como plasmáticas son parte de un depósito general de productos en circulación para mantenimiento de los procesos fisiológicos del organismo.

El mayor contenido de hidratos de carbonos en tejido muscular se encontraron con niveles de quitosano de 0 y 1%, lo cual se correspondió con los niveles de glucosa (cuadro 3) que disminuyó ( $p < 0,05$ ) a niveles superiores de quitosano, la cual es un indicador sensible a cambios fisiológicos y capacidad de respuesta inmune. Los bajos niveles de glucosa en plasma pueden indicar bajo estrés y mejor eficiencia metabólica (Li *et al.*, 2018). Cabe destacar que no se determinó en este trabajo si el aumento de carbohidratos es estructural o energético, ya que el método para determinarlos no permitió establecer esta diferencia.

La adición de diferentes concentraciones de quitosano, especialmente 4 y 5 %, disminuyó ( $p < 0,05$ ) el contenido de lípidos en el músculo de la tilapia (cuadro 2), y las concentraciones séricas de colesterol y triglicéridos (cuadro 3). En este sentido, Miao *et al.* (2020), expresan que el quitosano regula el metabolismo de las grasas, ácidos grasos y Esto podría atribuirse al efecto que ejerce el biopolímero quitosano sobre la utilización eficiente de los nutrientes estimulando el metabolismo de los lípidos. El quitosano puede quelar los iones metálicos o eliminar los radicales libres mediante la donación de hidrógeno o un par de electrones (Ngo

The addition of different concentrations of chitosan, especially 4 and 5 %, decreased ( $p < 0.05$ ) the lipid content in tilapia muscle (Table 2), and the serum concentrations of cholesterol and triglycerides (Table 3). In this sense, Miao *et al.* (2020), state that chitosan regulates the metabolism of fats, fatty acids and this could be attributed to the effect exerted by the chitosan biopolymer on the efficient use of nutrients by stimulating lipid metabolism. Chitosan can chelate metal ions or scavenge free radicals by donating hydrogen or an electron pair (Ngo and Kim, 2014), where an increase in superoxide dismutase activity may be as a consequence of a response to changes in the lipid composition of leukocyte cell membranes, which interfere with the production of cell activating factors (cytokines or chaperonins) that improve or decrease phagocytic capacity (Billar and Takahashi, 2018).

The activity of the enzyme superoxide dismutase (figure 1) was influenced ( $p < 0.05$ ) by the levels of chitosan 3 and 4 % in the diet, reaching values of 187.16 and 181.56 U.mL<sup>-1</sup> of blood, respectively. Soberanes-Yepiz *et al.* (2018), suggest that higher antioxidant values are a consequence of multiple oxidative reactions, therefore, this could indicate that it is the site of the highest production of free radicals. Kim and Thomas (2007), found that diets supplemented with chitosan for Atlantic salmon (*Salmo salar*) showed antioxidant activities and a reduction in lipid oxidation in terms of prevention of oxidative stress.

y Kim, 2014), donde un aumento de la actividad de superóxido dismutasa puede ser como consecuencia de una respuesta a cambios en la composición lipídica de las membranas celulares de los leucocitos, que interfieren con la producción de factores activadores de células (citocinas o chaperoninas) que mejoran o disminuyen la capacidad fagocítica (Biller y Takahashi, 2018).

The mechanism of action of the immunostimulating effect of chitosan within the body of the fish is not yet fully understood. Non-specific cellular immunity is known to comprise three defensive mechanisms: inflammation, phagocytosis, and non-specific cytotoxicity. It was observed that inflammation involves leukocytes and follows exposure to an antigenic

**Cuadro 3. Bioquímica plasmática en juveniles de tilapia roja con suplementación de quitosano en dieta.**

**Table 3. Plasma biochemistry in juvenile red tilapia with dietary chitosan supplementation.**

Variables (mg.dL <sup>-1</sup> )	Niveles de Quitosano en Dietas (%)						EE	p
	0	1	2	3	4	5		
Glucosa	57,33a	53,67a	58,33a	39,67b	36,33b	43,67b	2.591	0,014
Colesterol	140,67b	163,00a	156,67ab	110,33c	130,00c	134,33bc	8.221	0,019
Triglicéridos	159,67ab	199,67a	123,67b	72,33c	103,00c	91,00c	10.326	0,000

<sup>a, b, c, d</sup> Letras diferentes dentro de la misma fila, difieren para p <0.05. EE: Error Estándar.

<sup>a, b, c, d</sup> Different letters within the same row, differ for p <0.05. EE: Standard Error.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (figura 1) se vio influenciada (p<0,05) por los niveles de quitosano 3 y 4 % en la dieta alcanzando valores de 187,16 y 181,56 U.mL<sup>-1</sup> de sangre, respectivamente. Soberanes-Yepiz *et al.* (2018), sugieren que mayores valores de antioxidantes son consecuencia de múltiples reacciones oxidativas, por tanto, esto pudiera indicar ser el sitio de mayor producción de radicales libres. Kim y Thomas (2007), encontraron que las dietas suplementadas con quitosano para el salmón Atlántico (*Salmo salar*) mostraron actividades antioxidantes

challenge, after contact with the antigen, the affected area receives greater blood supply, followed by an increase in capillary permeability and migration of leukocytes from the blood into the tissue (Szweiser *et al.*, 2017), and although they only constitute about 1 % in the blood, they are involved in various allergic reactions and contribute to the repair of damaged tissue, as well as the elimination of tumor cells (Nakanishi *et al.*, 2015).

A significant leukocyte response (figure 2) was observed in fish fed chitosan in a dose-dependent

y una reducción de la oxidación de lípidos en términos de prevención del estrés oxidativo.

manner, which may be related to hematopoiesis involving the production of leukocyte cells mainly

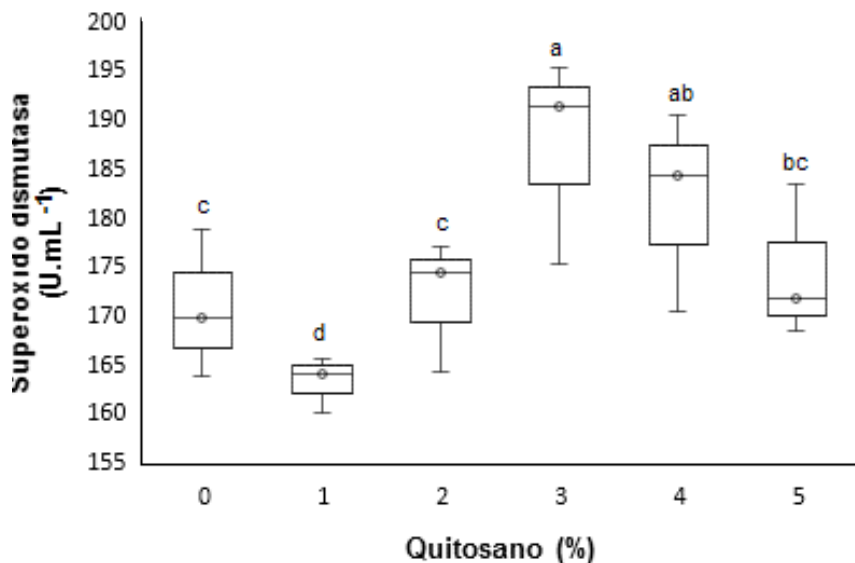


Figura 1. Actividad de superóxido dismutasa ( $p=0,0041$ ), en tilapia roja con suplementación de quitosano en dieta.

Figure 1. Superoxide dismutase activity ( $p = 0.0041$ ), in red tilapia with dietary chitosan supplementation.

El mecanismo de acción del efecto de inmunoestimulación del quitosano dentro del cuerpo del pez aún no se comprende completamente. Se conoce que la inmunidad celular no específica comprende tres mecanismos defensivos: la inflamación, la fagocitosis y la citotoxicidad no específica. Se observó que la inflamación involucra a los leucocitos y sigue a la exposición a un desafío antigénico, posteriormente al contacto con el antígeno, el área afectada recibe mayor irrigación sanguínea, seguida de un aumento en

in the head kidney in the case of teleost fish (Press and Evensen, 1999; Zapata *et al.*, 1996). Hematopoietic stem cells are located in this organ, which is why they have an extensive network to trap particles carried in the blood (Hanington *et al.*, 2009), given that larger populations of macrophages and lymphocytes are located in the kidney and spleen capable of initiating an immune response (Press and Evensen, 1999).

This suggests that the level of chitosan in the diet was able to

la permeabilidad capilar y la migración de los leucocitos de la sangre hacia el tejido (Szwejsjer *et al.*, 2017), y aunque solo constituyen alrededor del 1 % en la sangre, están implicados en diversas reacciones alérgicas y contribuyen a la reparación del tejido dañado, así como a la eliminación de células tumorales (Nakanishi *et al.*, 2015).

Se observó una respuesta significativa de leucocitos (figura 2) en peces alimentados con quitosano de manera dependiente de la dosis, lo cual se puede relacionar con la hematopoyesis que implica la producción de células leucocitarias principalmente en el riñón cefálico en el caso los peces teleósteos (Press y Evensen, 1999; Zapata *et al.*, 1996). En este órgano se localizan las células madre hematopoyéticas, por lo que tienen una extensa red para atrapar partículas acarreadas en la sangre (Hanington *et al.*, 2009), dado a que en el riñón y el bazo se localizan mayores poblaciones de macrófagos y linfocitos capaces de iniciar una respuesta inmune (Press y Evensen, 1999).

Esto sugiere que el nivel de quitosano en dieta pudo estimular el microambiente donde se desarrollan las células hematopoyéticas y factores y proteínas de crecimiento intracelulares. En este sentido, se reportó que la proteína alfa de unión al potenciador CCAAT (C/EBP $\alpha$ ), es requerida para el desarrollo de granulocitos, pero también promueve la diferenciación de células madres hematopoyéticas, sin embargo, cuando es deficiente C/EBP $\alpha$ , se bloquea la diferenciación hacia el

stimulate the microenvironment where hematopoietic cells and intracellular growth factors and proteins develop. In this sense, it was reported that the alpha protein binding to the enhancer CCAAT (C/EBP $\alpha$ ) is required for the development of granulocytes, but it also promotes the differentiation of hematopoietic stem cells, however, when C/EBP $\alpha$  is deficient, it blocks differentiation towards the myeloid lineage (Zhang *et al.*, 2004). Dietary supplementation with chitosan stimulated immunological parameters by increasing antioxidant activity and leukocyte content.

## Conclusion

The biochemical and immune response in juvenile red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*) was favored with dietary chitosan supplementation.

## Acknowledgment

The research was supported by the Universidad Técnica Estatal de Quevedo and the Projects: FOCYCYT-7ma/PFOC7-48-2020 and EMBLEMÁTICOS/PEMBL-003-2018. Our gratitude for the technical assistance to Ing. Lourdes Ramos, Ing. Tania Leones, and Lic. Wendy Hidalgo.

*End of English Version*

---

linaje mieloide (Zhang *et al.*, 2004). La suplementación dietética con quitosano estimuló parámetros

inmunológicos al incrementar la actividad antioxidante y contenido de leucocitos.

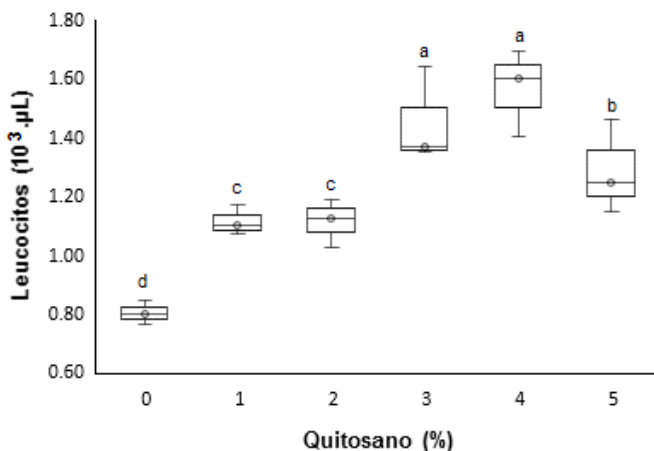


Figura 2. Contenido de Leucocitos ( $p=0,010$ ), en tilapia roja con suplementación de quitosano en dieta.

Figure 2. Leukocyte content ( $p=0.010$ ), in red tilapia with dietary chitosan supplementation.

### Conclusión

La respuesta bioquímica e inmune en juveniles de tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*) se favoreció con suplementación de quitosano en dieta.

Proyectos: FOCYCYT-7ma/PFOC7-48-2020 y EMBLEMÁTICOS/PEMBL-003-2018.

Nuestro agradecimiento por la asistencia técnica a Ing. Lourdes Ramos, Ing. Tania Leones, y Lic. Wendy Hidalgo.

### Agradecimientos

La investigación estuvo respaldada por la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y los

### Literatura citada

Abdel-Ghany, H. M. and M. E. S. Salem. 2019. Effects of dietary chitosan supplementation on farmed fish; a review. *Rev. Aquacult.* 12(1): 438-



452. <https://doi.org/10.1111/raq.12326>
- Alishahi, A. and M. Aïder. 2012. Applications of chitosan in the seafood industry and aquaculture: a review. Food Bioproc Tech. 5(3): 817-830. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0664-x>
- Al-Sagheer, A., H. Mahmoud, F. Reda, S. Mahgoub and M. Ayyat. 2018. Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. Aquacult. Nutr. 24: 1006-1014. <https://doi.org/10.1111/anu.12637>
- Association of Official Analytical Chemists International (AOAC). 2019. Official Methods of Analysis of AOAC International, 21st Edition. Gaithersburg, Maryland, USA. <https://www.aoc.org/official-methods-of-analysis-21st-edition-2019/>
- Azaza, M. S., K. Wassim, F. Mensi, A. Abdelmouleh, B. Brini and M. M. Kraïem. 2009. Evaluation of faba beans (*Vicia faba* L. var. *minuta*) as a replacement for soybean meal in practical diets of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Aquaculture. 287: 174-179. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.10.007
- Azizoglu, A. and I. Cengizler. 1996. An investigation on determination of some hematologic parameters in healthy *Oreochromis niloticus* (L.). Turk. J. Vet. Anim. Sci. 20: 425-431.
- Biller, J. D. and L. S. Takahashi. 2018. Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. An. Acad. Bras. Ciênc. 90 (4): 3403-3914. <https://doi:10.1590/0001-3765201820170730>.
- Brum, A., S. A. Pereira, M. S. Owatari, E. C. Chagas, F. C. M. Chaves, J. L. P. Mourinho and M. L. Martins. 2017. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. Aquaculture 468: 235-243. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.020>
- Esteban, M. A., A. Cuesta, J. Ortuno and J. Meseguer. 2001. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. Fish Shellfish Immunol. 11: 303-315. <https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0315>
- Fadl, S.E., G. A. El-Gammal, W.S. Abdo, M. Barakat, O. A. Sakr, E. Nassef, D. M. Gad and H. S. El-Sheshtawy, 2020. Evaluation of dietary chitosan effects on growth performance, immunity, body composition and histopathology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) as well as the resistance to *Streptococcus agalactiae* infection. Aquac. Res. 51: 1120-1132. <https://doi.org/10.1111/are.14458>
- FAO. 2020. FishStatJa tool for fishery statistics analysis, Release 2.0.0. Universal software for fishery statistical time series. Global capture and aquaculture production: Quantities 1950-2018; Aquaculture values 1984-2018. Food and Agriculture Organization (FAO) Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. Rome. <http://www.fao.org/fishery/>
- Goddard, S. 1996. Feeding and diet. p.23-33. In: Chapman and Hall (Eds). Feed Management in Intensive Aquaculture. New York, USA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1173-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1173-7_2)
- Hanington, P. C., J. Tam, B. A. Katzenback, S. J. Hitchen, D. R. Barreda and M. Belosevic. 2009. Development of macrophages of cyprinid fish. Dev. Comp. Immunol. 33: 411-429. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.11.004>
- Heo, G. J., J. H. Kim, B. G. Jeon and K. Y. R. J. Park. 2001. Effects of FST-chitosan mixture on cultured rockfish (*Sebastes schlegelii*) and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Korean J. Vet. Public. Heal. 25(3): 141-149.
- Hrubec, T. and S. Smith. 2010. Hematology of Fishes. p. 994-1003. In: Weiss, D. J., Wardrop, K. J. and O. W. Schalm's (Eds). Veterinary Hematology, 6th

Edition. Wiley-Blackwell. Iowa, USA. <https://www.worldcat.org/title/schalms-veterinary-hematology/oclc/338288636>

- Jim, F., P. Garamumhango and C. Musara. 2017. Comparative analysis of nutritional value of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus), Nile Tilapia, Meat from three different ecosystems. *J. Food Qual.* <https://doi.org/10.1155/2017/6714347>
- Kim, K. W. and R. L. Thomas. 2007. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food Chem.* 101: 308-313. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.038>
- Kumari, J. and P. K. Sahoo. 2006. Dietary levamisole modulates the immune response and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Aquac. Res.* 37(5): 500-509. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01456.x>
- Lara-Flores, M., M. A. Olvera-Novoa, B. E. Guzmán-Méndez and W. López-Madrid. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 216(4): 193-201. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00277-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00277-6)
- Li, S., C. Sang, J. Zhang, N. Chen, Z. Li, P. Jin and X. Huang. 2018. Effects of acute hyperglycemia stress on plasma glucose, glycogen content, and expressions of glycogen synthase and phosphorylase in hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂). *Fish. Physiol. Biochem.* 44: 1185-1196. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0508-y>
- Mahmoud, H. K., A. A. Al-Sagheer, F. M. Reda, S. A. Mahgoub and M. S. Ayyat. 2017. Dietary curcumin supplement influence on growth, immunity, antioxidant status, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 475: 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.043>
- Malachy, N. O. A., K. P. Pramod, K. Kumar and P. Nalini. 2017. Assessment of mutagenic, hematological and oxidative stress biomarkers in liver of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in response to sublethal verapamil exposure. *Drug Chem. Toxicol.* 40(3): 286-294. <https://doi.org/10.1080/01480545.2016.1219914>
- Mastan, S. A. 2015. Use of immunostimulants in aquaculture disease management. *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 2(4): 277-280. <https://www.fisheriesjournal.com/archives/2015/vol2issue4/PartF/2-4-59.pdf>
- McCord, J. M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5)
- Mehana, E. E., H. A. Rahmani and M. S. Aly. 2015. Immunostimulants and Fish Culture: An Overview. *Annu. Res. Rev. Biol.* 5(6): 477-489. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2015/9558>
- Méndez-Martínez, Y., Y. G. Torres-Navarrete, Y. Pérez-Tamames, M. Romás-Viltres, y E. Cortés-Jacinto (2021). Effect of duckweed meal dietary inclusion on growth performance and survival of African catfish fingerlings. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 38(1): 84-104. [https://doi.org/10.47280/RevFacAgron\(LUZ\)](https://doi.org/10.47280/RevFacAgron(LUZ))
- Méndez-Martínez, Y., Y. Pérez, D.M. Verdecia, E. Cortés-Jacinto, O.F. Cevallos- Falquez, y O. Romero. 2019. Effect of the inclusion of *Azolla filiculoides* meal on the growth and survival of red tilapia small fish (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*). *Cuba. J. Agric. Sci.* 53: (2): 289-299. <http://scielo.sld.cu/pdf/cjas/v53n3/2019-3480-cjas-53-03-289.pdf>
- Miao, Z., L. Guo, Y. Liu, W. Zhao and J. Zhang. 2020. Effects of dietary supplementation of chitosan on carcass composition and meat quality in growing *Huoyan geese*. *Poult. Sci. J.* 99(6): 3079-3085. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.03.025>
- Nakanishi, T., Y. Shibasaki, Y. Matsuura. 2015. T Cells in Fish. *Biology.* 4: 640-663. <https://doi.org/10.3390/biology4040640>



- Ngo, D.-H. and S.-K. Kim. 2014. Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their derivatives. *Adv. Food Nutr. Res.* 73: 15-31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800268-1.00002-0>.
- Pérez, R., B. Romeu, M. Lastre, Y. Morales, O. Cabrera, L. Reyes, E. González, S. Sifontes, y O. Pérez. 2014. Inmunopotenciadores para la acuicultura TT-Immunopotentiators for the Aquaculture. *Vaccinmonitor*. 23(1): 24–31. <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v23n1/vac05114.pdf>
- Press, C. M. and O. Evensen. 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol.* 9: 309-318. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0181>
- Sakai, M., H. Kamiya, S. Ishii, S. Atsuta and M. Kobayashi. 1992. The immunostimulating effects on chitin in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Asian Aquacult.* 1: 413-417.
- Schettler G. and E. NusselE. 1975. Colorimetric determination of Triglycerides and cholesterol. *Arb. Med. Soz. Med. Prav. Med.* 10: 25.
- Trinder, P. 1969. Determination of blood glucose using an oxidaseperoxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J. Clin. Path.* 22(2): 158-161. DOI: 10.1136/jcp.22.2.158
- Soberanes-Yepiz, M. L., Y. Méndez-Martínez, M. U. García-Guerrero, F. Ascencio, J. Violante-González, S. García-Ibañez, y E. Cortés-Jacinto. 2018. Superóxido dismutase activity in tissues of juvenile cauque river prawn (*Macrobrachium americanum* Bate, 1868) fed with different levels of protein and lipid. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 46(3):543–55. <http://doi.org/10.3856/vol46-issue3-fulltext-7>
- Szwejsjer, E., B. M. L. K. Verburg-van, M. Maciuszek, and M. Chadzinska. 2017. Estrogen-dependent seasonal adaptations in the immune response of fish. *Horm. Behav.* 88: 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.10.007>
- Udo, I. U., U. Etukudo and U. I. U. Anwana. 2018. Effects of chitosan and chitosan nanoparticles on water quality, growth performance, survival rate and meat quality of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Nanoscience.* 1(1): 12-25. <https://doi.org/10.31058/j.nano.2018.11002>
- Zaki, M. A., M. El-S. Salem, M. M. Gaber and A. M. Nour. 2015. Effect of chitosan supplemented diet on survival, growth, feed utilization, body composition and histology of seabass (*Dicentrarchus labrax*). *World Journal of Engineering and Technology.* 3: 38-47. <https://doi.org/10.4236/wjet.2015.34C005>
- Zapata, A. G., A. Chibá and A. Varas. 1996. Cells and tissues of the immune system of fish. p. 61-62. In: Iwama, G., and T. Nakanishi (Eds). *The fish immune system: organism, pathogen and environment*. Academic Press, Ltd., London. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9731677>
- Zhang, P, J. Iwasaki-Arai, H. Iwasaki, M. L. Fenyus, T. Dayaram, and B. M. Owens. 2004. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity.* 21(6): 853-863. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.11.006>

## Adición de hierbas aromáticas en la elaboración de una bebida carbonatada a base de maracuyá

Adding aromatic herbs in the elaboration of a carbonated drink based on passion fruit

Adição de ervas aromáticas na preparação de uma bebida carbonatada à base de maracujá

Rubén Fabricio Cedeño Barre<sup>1</sup> y Wagner Antonio Gorozabel Muñoz<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Maestría en Agroindustria. Instituto de Postgrado. Universidad Técnica de Manabí, Ecuador. Correo electrónico: rubencede87@hotmail.com, . <sup>2</sup>Departamento de Procesos Agroindustriales. Facultad de Ciencias Zootécnicas. Universidad Técnica de Manabí, Ecuador. Correo electrónico: wagner.gorozabel@utm.edu.ec, .

### Resumen

Generalmente las empresas se han limitado a ofrecer productos a base de aditivos artificiales, dejando insatisfecho al consumidor que impulsado por las preferencias de productos más sanos busca una bebida con mejores características sensoriales y nutritivas. En este trabajo se elaboró una bebida carbonatada a base de maracuyá (*Passiflora edulis*) con la adición de las hierbas aromáticas hierbabuena (*Mentha spicata*), hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y jengibre (*Zingiber officinale*), a tres concentraciones (1, 3 y 5%). Para identificar diferencias fisicoquímicas y sensoriales en las bebidas elaboradas, se evaluaron los parámetros fisicoquímicos: °Brix, acidez, pH y volumen de CO<sub>2</sub>, basados en la NTE INEN 1101-2017 y posteriormente, se sometieron a una prueba de aceptabilidad por treinta jueces no entrenados. Se utilizó un diseño completamente al azar bifactorial AxB, para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey. Para el análisis de resultados se utilizó la estadística no paramétrica haciendo uso de la prueba de KRUSKAL WALLIS y para determinar la diferencia de medias se utilizó la prueba de U de Mann Whitney. Los resultados del ANOVA para los parámetros fisicoquímicos demostraron significancia estadística (p>0,05) para los °Brix y pH; mientras que para las variables acidez y volumen de CO<sub>2</sub> no se observaron diferencias estadísticamente significativas (p>0,05). La bebida elaborada con

Recibido: 12-11-2020 • Aceptado: 03-03-2021.

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: wagner.gorozabel@utm.edu.ec

hierba luisa al 3% presentó una mayor concentración de sólidos solubles con un valor de 14,03 °Brix, y un pH de 3,08, demostrando que estos resultados cumplen con los parámetros establecidos por la norma. Sensorialmente la bebida elaborada con hierba luisa al 1% obtuvo una mejor aceptación con respecto al sabor por parte de los panelistas.

**Palabras clave:** Análisis fisicoquímico, análisis sensorial, bebida carbonatada, *Passiflora edulis*, *Mentha spicata*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale*.

### Abstract

Generally, companies have limited themselves to offering products based on artificial additives, leaving the consumer dissatisfied, who, driven by preferences for healthier products, seeks a drink with better sensory and nutritional characteristics. In this work, a carbonated drink based on passion fruit (*Passiflora edulis*) was prepared with the addition of the aromatic herbs peppermint (*Mentha spicata*), lemon verbena (*Cymbopogon citratus*) and ginger (*Zingiber officinale*), at three concentrations (1, 3 and 5%). To identify physicochemical and sensory differences in the elaborated beverages, the physicochemical parameters °Brix, acidity, pH and CO<sub>2</sub> volume were evaluated, based on the NTE INEN 1101-2017 and were subsequently subjected to an acceptability test by thirty untrained judges. A completely randomized bifactorial AxB design was used, for the comparison of means the Tukey al test was used (p <0.05). For the analysis of results, non-parametric statistics were used using the KRUSKAL WALLIS test and the Mann Whitney U test was used to determine the difference in means. The results of the ANOVA for the physicochemical parameters showed statistical significance (p>0.05) for the °Brix and pH; and for the variables acidity and volume of CO<sub>2</sub>, no statistically significant differences were observed (p> 0.05). The drink made with lemon verbena at 3% presented a higher concentration of soluble solids with a value of 14.03 °Brix, and pH of 3.08, showing that these results comply with the parameters established by the standard. Sensorially, the drink made with lemon verbena at 1% obtained a better acceptance with respect to taste by the panelists.

**Key words:** Physicochemical analysis, sensory analysis, carbonated drink, *Passiflora edulis*, *Mentha spicata*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale*.

### Resumo

Geralmente, as empresas se limitam a oferecer produtos à base de aditivos artificiais, deixando o consumidor insatisfeito, que, movido pela preferência por produtos mais saudáveis, busca uma bebida com melhores características sensoriais e nutricionais. Neste trabalho, uma bebida carbonatada à base de maracujá (*Passiflora edulis*) foi preparada com a adição das ervas aromáticas de hortelã-pimenta (*Mentha spicata*), limão verbena (*Cymbopogon citratus*) e

gengibre (*Zingiber officinale*), em três concentrações (1, 3 e 5%). Para identificar diferenças físico-químicas e sensoriais nas bebidas elaboradas, foram avaliados os parâmetros físico-químicos ° Brix, acidez, pH e volume de CO<sub>2</sub>, com base no NTE INEN 1101-2017 e posteriormente submetidos ao teste de aceitabilidade por trinta juízes não treinados. Foi utilizado um delineamento bifatorial AxB inteiramente casualizado, para a comparação de médias foi utilizado o teste de Tukey al (p <0,05). Para a análise dos resultados, foram utilizadas estatísticas não paramétricas por meio do teste KRUSKAL WALLIS e o teste U de Mann Whitney para determinar a diferença de médias. Os resultados da ANOVA para os parâmetros físico-químicos mostraram significância estatística (p>0,05) para o °Brix e pH; e para as variáveis acidez e volume de CO<sub>2</sub>, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (p> 0,05). A bebida feita com limão verbena a 3% apresentou maior concentração de sólidos solúveis com valor de 14,03 °Brix, e ao pH de 3,08, mostrando que esses resultados obedecem aos parâmetros estabelecidos pela padrão. Sensorialmente, a bebida feita com verbena de limão a 1% obteve uma melhor aceitação quanto ao paladar pelos provadores.

**Palavras-chave:** Análise físico-química, análise sensorial, bebida carbonatada, *Passiflora edulis*, *Mentha spicata*, *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale*.

## Introducción

El agua es la fuente de hidratación principal. Sin embargo, por problemas desde la antigüedad y la atracción por experimentar diferentes sabores contribuyeron al uso de bebidas alternativas (Muñoz *et al.*, 2020).

Las bebidas carbonatadas son bebidas saborizadas, elaboradas con agua carbonatada, acidulantes, antioxidantes, conservadores y endulzadas con edulcorantes naturales o sintéticos (Kregiel, 2015). Según la NTE INEN 1101-2017 las gaseosas son bebidas no alcohólicas, obtenidas por disolución en agua potable del gas dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), aditivos alimentarios con o sin una mezcla de ingredientes como azúcares, jugos de frutas, te o hierbas o sus extractos.

Las bebidas carbonatadas son las más consumidas en el mundo. Durante

## Introduction

Water is the main source of hydration. However, due to problems since ancient times and the attraction to experience different flavors, the use of alternative drinks was supported. (Muñoz *et al.*, 2020).

Carbonated drinks are flavored drinks, made with carbonated water, acidulants, antioxidants, preservatives and sweetened with natural or synthetic sweeteners (Kregiel, 2015). According to NTE INEN 1101-2017, Soft drinks are non-alcoholic beverages, obtained by dissolving carbon dioxide gas (CO<sub>2</sub>) in drinking water and food additives with or without a mixture of ingredients such as sugars, fruit juices, tea or herbs and maybe their extracts.

los últimos 10 años la industria de bebidas en Colombia ha presentado crecimientos anuales entre el 5% y el 8% y una producción de \$13,6 billones para 2017 según la Encuesta Anual Manufacturera del Dane (IAIimentos, 2019). En Ecuador, el consumo per cápita de bebidas carbonatadas es de 50 L.año<sup>-1</sup> (INEC, 2015). La población joven entre los 12 a 19 años registra un consumo del 81%, siendo este el grupo que más consume este tipo de bebidas (Silva y Duran, 2014).

Las estadísticas permiten observar el gran consumo de gaseosas, debido en parte por el comercio como refuerzo dado a grandes marcas de gaseosas como Coca-Cola y gracias a la prominente globalización que induce al consumismo (Salgado *et al.*, 2017).

A este respecto, Ramírez *et al.* (2016), señala que el aumento en el consumo de bebidas azucaradas ocasiona riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles como obesidad, diabetes tipo 2, hipertensión arterial, enfermedades del corazón y ciertos tipos de cáncer, además de incidir en el síndrome metabólico

El cultivo de maracuyá (*Passiflora edulis*), es originario de la región amazónica de Brasil. En la actualidad se cultiva en Australia, Nueva Guinea, Sri Lanka, Sudafrica, India, Taiwan, Hawaii, Brasil, Pru, Ecuador, Venezuela y Colombia (Amaya, 2010). Por sus propiedades medicinales, los frutos del genero *Passiflora* son un potencial antioxidante y antimicrobiano siendo una alternativa para el control de enfermedades digestivas (Pabón *et al.*, 2011).

Carbonated drinks are the most consumed in the world. During the last 10 years, the beverage industry in Colombia has presented annual growth between 5% and 8% with a production of \$13.6 billion in 2017 according to the Dane Annual Manufacturing Survey (IAIimentos, 2019). In Ecuador, the per capita consumption of carbonated beverages is 50 L.year<sup>-1</sup> (INEC, 2015). Young population between 12 and 19 years old registers a consumption of 81%, being this group, which has a higher consumption of soft drinks (Silva and Duran, 2014).

The statistics allows to observe a large consumption of this beverages, as a consequence of trade by soft drinks brands such as Coca-Cola and a prominent globalization that induces consumerism (Salgado *et al.*, 2017).

Ramírez *et al.* (2016), shows that the increase consumption of sugary drinks causes some risks to suffer chronic non-communicable diseases such as obesity, type 2 diabetes, high blood pressure, heart disease and certain types of cancer besides to affect the metabolic syndrome.

The passion fruit cultivation (*Passiflora edulis*), is native to Brazil, Amazon region. At the present time it is cultivated in Australia, New Guinea, Sri Lanka, South Africa, India, Taiwan, Hawaii, Brazil, Peru, Ecuador, Venezuela and Colombia (Amaya, 2010). Due to their medicinal properties, the fruits of *Passiflora* genus are a potential antioxidant and antimicrobial, being an alternative for the control of digestive diseases (Pabón *et al.*, 2011).

Las plantas aromáticas, medicinales y condimentarias se han utilizado desde hace 60.000 años aproximadamente (Kiani *et al.*, 2016). Son reconocidas como un recurso importante a nivel mundial, dado que contribuyen al desarrollo de la economía desde la etapa de cultivo y post cosecha en el sector agrícola hasta el procesamiento de productos en la industria y la comercialización (Kala, 2015).

Muchas hierbas aromáticas son reconocidas por tener propiedades medicinales y un impacto beneficioso sobre la salud como la prevención de diversas enfermedades cardiovasculares, neurológicas y cancerígenas (Gan *et al.*, 2010).

Las hojas de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) tienen entre 30 y 100 cm de largo y de 1 a 1,5 cm de ancho, bordes duros y nervio central fuerte. Aunque crece adecuadamente en una gama de suelos, su mayor productividad es en suelos fértiles de textura media a ligera (franco a franco arenoso) y con buena capacidad de retención de agua. Sin embargo, se desarrolla bien en zonas con temperatura media entre 22 y 28°C (Naik *et al.*, 2010).

La hierbabuena (*Mentha spicata*) es una especie perenne de hábito herbáceo de 43-84 cm de altura, rizomatosa, de tallos glabros, angulosos, de color violáceo, de hojas simples, ovaladas de tamaño variable, levemente dentadas, con frecuencia arqueadas hacia abajo, rugosas por el haz, con nervios marcados por el envés, glabras o pelosas solamente en los nervios y margen aserrado,

Aromatic, medicinal and condiment plants have been used for approximately 60,000 years (Kiani *et al.*, 2016). They are recognized as an important worldwide resource, because they contribute to the economy development from the cultivation and post-harvest stage in the agricultural sector to products processing in the industry, and commercialization. (Kala, 2015).

Many aromatic herbs are recognized for having medicinal properties and a beneficial impact on health, such as prevention of various cardiovascular, neurological and carcinogenic diseases (Gan *et al.*, 2010).

The leaves of lemon verbena (*Cymbopogon citratus*) has a length from 30 to 100 cm and width from 1 to 1.5 cm, with hard edges and a strong midrib. Although, it grows well in different types of soils, its highest productivity is in fertile soils of medium to light texture (loam to sandy loam) and with good water retention capacity. However, it does well in areas with an average temperature between 22 and 28°C (Naik *et al.*, 2010).

Spearmint (*Mentha spicata*) is a perennial species of herbaceous habit with a height of 43-84 cm, rhizomatous, with glabrous stems, angular, purple in color, with simple, oval leaves of variable size, slightly toothed, frequently arching downwards; rough on the upper side, with veins marked on the underside, glabrous or hairy only on the veins and a serrated margin, dark green in color, shiny on the



de color verde oscuro, brillante en el haz (Jardín Botánico, 2021). La hierbabuena se utiliza para el dolor de estómago, hipertensión arterial, dolor de cabeza, heridas, baños amebas y aromáticas (Morales *et al.*, 2012).

El jengibre (*Zingiber officinale*) es una planta perenne perteneciente a la familia Zingiberaceae. La familia de la que procede cuenta con más de 24 géneros y unas 300 especies (Acuña y Torres, 2010).

La tendencia actual está enfocada en consumir alimentos naturales y nutritivos, por esta razón, resulta importante elaborar una bebida carbonatada a base de maracuyá (*Passiflora edulis*) con la adición de hierbas aromáticas como la hierbabuena (*Mentha spicata*), hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), jengibre (*Zingiber officinale*) en diferentes concentraciones y evaluar sus propiedades físicoquímicas y sensoriales establecidos en la Norma INEN 1101:2017 para bebidas carbonatadas.

## Materiales y métodos

### Ubicación del ensayo y material vegetal

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de frutas de la Facultad de Ciencias Zootécnicas, extensión Chone de la Universidad Técnica de Manabí, ubicada geográficamente en el cantón Chone km 2 ½ vía Boyacá, sitio Anima, a 0°41' y 17" de latitud sur y 80° 7' 25,60" de longitud oeste. La materia prima que se utilizó en la investigación fue maracuyá (*Pasiflora edulis*) y tres tipos de

upper side (Botanical Garden, 2021). Peppermint is used for stomach pain, high blood pressure, headache, wounds, amoeba and aromatic baths (Morales *et al.*, 2012).

Ginger (*Zingiber officinale*) is a perennial plant belonging to the Zingiberaceae family. The family from which it comes has more than 24 genera and 300 species (Acuña & Torres, 2010).

The current trend is focused on consuming natural and nutritious food. For this reason, is important to make a carbonated drink based on passion fruit (*Passiflora edulis*) with the addition of aromatic herbs such as spearmint (*Mentha spicata*), lemon verbena (*Cymbopogon citratus*), ginger (*Zingiber officinale*) in different concentrations and evaluate their physicochemical and sensory properties with respect to the established values in the INEN 1101: 2017 Standard for carbonated beverages regulations.

## Materials and methods

### Test location and vegetable material

This research was carried out in a Fruit Laboratory of the Zootechnical Sciences Faculty (Chone extension) at the Manabí Technical University, located in cantón Chone, km 2 ½ via Boyacá in Anima site at 0° 41'17" south latitude and 80°7'25.60" west longitude. The raw material handled was passion fruit (*Pasiflora edulis*) along with three types of aromatic herbs: good grass, lemon

hierbas (aromáticas) hierba buena, hierba luisa y jengibre, las cuales son frecuentemente usadas en la zona, por su agradable sabor, fueron adquiridas en el mercado municipal del cantón Chone.

#### **Parámetros fisicoquímicos.**

Los parámetros físico-químicos fueron evaluados tomando como referencia la Norma (INEN 1101, 2017), se realizaron los siguientes análisis:

**pH** (NTE INEN 1087, 1984). Método potenciómetro, se empleó un potenciómetro digital (Marca “pH meter”).

**Sólidos solubles** (NTE INEN 1083, 1984). Método refractométrico, en la cual se usó un refractómetro digital (Marca Mettler Toledo).

**Acidez titulable** (NTE INEN 1091, 1984). Método potenciométrico. Los resultados se expresaron como porcentaje de ácido cítrico.

**Volumen de CO<sub>2</sub>** (NTE INEN 1082, 1984). Se midió siguiendo el procedimiento que estipula determinar los volúmenes de gas carbónico disueltos en un volumen de bebida, en función de la presión y temperatura.

#### **Análisis sensorial**

Para el análisis sensorial se entregaron las muestras a una temperatura de 6 °C debidamente codificadas y en orden aleatorio a treinta jueces no entrenados y como herramienta se utilizó un test hedónico de nueve (9) puntos o escala Likert. Los atributos evaluados en grado de preferencia por los catadores fueron: sabor olor, color y apariencia general.

verbena and ginger, which are frequently used in this area, due to their pleasant taste. These herbs were acquired in the municipal market of cantón Chone.

#### **Physicochemical parameters**

To study these parameters, the following analyzes were evaluated taking into account the Standard (INEN 1101, 2017):

**pH** (NTE INEN 1087, 1984). Potentiometer method, where a digital potentiometer was used (Brand “pH meter”).

**Soluble solids** (NTE INEN 1083, 1984). Refractometric method, in which a digital refractometer was used (Mettler Toledo Brand).

**Titratable acidity** (NTE INEN 1091, 1984). Potentiometric method wherein the results were expressed as a citric acid percent.

**CO<sub>2</sub> Volume** (NTE INEN 1082, 1984). It was measured following the procedure that stipulates the determination of carbon dioxide volumes dissolved in a beverage, as a function of pressure and temperature.

#### **Sensory analysis**

The samples were delivered at a temperature of 6 °C, duly coded with a random order to thirty untrained judges, which used a nine (9) points hedonic test or a Likert scale as a tool to evaluate the beverages attributes in function of their preferences of taste, smell, color and general appearance.

#### **Soft Drink Processing Steps**

Figure 1 shows a flowchart of the passion fruit soft drink processing steps.

## Proceso de elaboración de la bebida carbonatada

En la figura 1 se presenta el flujograma del proceso de elaboración de la bebida carbonatada de maracuyá.

## Process description

**Selection.** Fruits with a healthy, pleasant and uniform appearance besides a full maturation were selected.

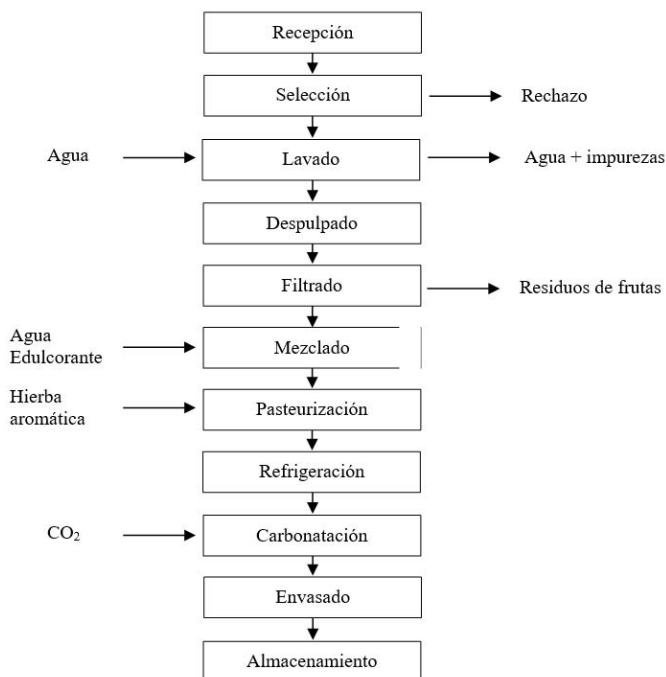


Figura 1. Proceso de elaboración de una bebida carbonatada de maracuyá.

Figure 1. Process of making a carbonated passion fruit drink.

### Descripción del proceso

**Selección.** Se seleccionaron frutos de maracuyá de aspecto sano, agradable, uniformes y de maduración completa.

**Lavado.** El lavado se realizó con agua potable por el método de inmersión, y con el uso de una esponja

**Washed.** Washing was carried out with potable water by the immersion method, with the use of a sponge to remove any impurities on the fruit surface.

**Pulped.** It was made manually. The pulp was homogenized using a domestic blender (Oster Brand).

se retiró cualquier impureza en la superficie de la fruta.

**Despulpado.** Se realizó de forma manual y la pulpa de homogenizo empleando una licuadora doméstica (Marca Oster). Una vez culminado el proceso, se determinó el pH (3,15) y los sólidos solubles (11 °Brix) del zumo de la pulpa de maracuyá.

**Filtrado.** Se realizó mediante el uso de un colador para retirar los residuos de las frutas.

**Mezclado.** Se realizó la mezcla empleando 2400 mL de agua, 600 mL de pulpa y 405 g de azúcar por cada repetición.

**Pasteurización.** El objetivo fue eliminar cualquier microorganismo presente en el producto mediante el calentamiento hasta una temperatura de 65°C durante 15 minutos. Previamente troceadas y en forma de infusión se añadió la respectiva hierba aromática a las diferentes concentraciones (1, 3 y 5%), el extracto se obtuvo con ayuda de un cedazo durante cinco (5) minutos.

**Refrigeración.** La mezcla se almacenó en tanques (Cornelius) herméticamente cerrados y se refrigeró a 2°C por 24 horas.

**Carbonatación.** Se procedió a carbonatar la bebida con 2,5 volúmenes de CO<sub>2</sub> por las siguientes 24 horas.

**Envasado.** Utilizando una llenadora isobárica se realizó el envasado en botellas color ámbar (330 mL) para evitar que la luz afecte el producto final, de inmediato se realizó un sellado manual utilizando una chapadora, y por último se procedió a pasteurizar el producto a

Once the process was finished, the pH (3.15) and the soluble solids (11 °Brix) of the passion fruit juice were determined.

**Filtered out.** It was done by using a strainer to remove the residues from the fruits.

**Mixed.** The mixture was made using 2400 mL of water, 600 mL of pulp and 405 g of sugar per each repetition.

**Pasteurization.** The objective was to eliminate any microorganisms present in the product by heating to a temperature of 65 °C for 15 minutes. The aromatic herbs previously chopped and with an infusion form were added at different concentrations (1, 3 and 5%). the extract was obtained through the pass of the juice for a sieve during five (5) minutes.

**Refrigeration.** The mixture was stored in hermetically sealed tanks (Cornelius) and refrigerated at 2 °C for 24 hours.

**Carbonation.** The drink was carbonated with 2.5 volumes of CO<sub>2</sub> during the next 24 hours.

**Packing.** Using an isobaric filler, the packaging was made in amber bottles (330 mL) to prevent light effects in the final product. After that, a manual sealing was carried out using a plating machine and finally the product was pasteurized.

**Storage.** The carbonated drink was stored at a temperature of 2 °C.

### **Experimental design and statistical analysis**

A completely randomized bifactorial A x B design was used, where the factors under study were: A: aromatic herbs types (A1 = good

una temperatura de 65°C durante 15 minutos.

**Almacenamiento.** La bebida carbonatada se almacenó a una temperatura de 2°C

### Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar bifactorial AxB, donde los factores en estudio fueron: A: tipos de hierbas aromáticas ( $A_1$ =hierba buena,  $A_2$ =hierba luisa y  $A_3$ =jengibre) y B: concentración de hierbas aromáticas ( $B_1$ =1%,  $B_2$ =2% y  $B_3$ =3%), respectivamente. La investigación se conformó de nueve tratamientos con tres repeticiones. Para la comparación de los promedios de los parámetros físico-químicos se utilizó la prueba de Tukey a un nivel de significancia del 5% de acuerdo a los resultados del ANOVA.

Para el análisis de los resultados sensoriales, se utilizó la estadística no paramétrica haciendo uso de la prueba de KRUSCAL WALLIS, y en la comparación de promedios en los casos donde hubo significancia estadística se utilizó la prueba de U de Mann Whitney. El procesamiento de datos se realizó utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017).

Los tratamientos estudiados se detallan en el cuadro 1

## Resultados y discusión

### Parámetros fisicoquímicos

Los resultados obtenidos del ANOVA en la evaluación de los parámetros físico-químicos de la bebida carbonatada con hierbas aromáticas

grass,  $A_2$  = lemon verbena and  $A_3$  = ginger) and B: aromatic herbs concentration ( $B_1$  = 1%,  $B_2$  = 2% and  $B_3$  = 3%), respectively. The research consisted of nine treatments with three repetitions. To compare the averages of the physical-chemical parameters, the Tukey test was used at a significance level of 5% according to the results of the ANOVA.

For sensory analysis results, the non-parametric statistics was used through the KRUSCAL WALLIS test. However, for cases where the comparison of means had statistical significance, the Mann Whitney U test was used. The data processing was carried out using the statistical program InfoStat version 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017).

The treatments studied are detailed in Table 1.

## Results and discussion

### Physicochemical parameters

The results obtained from the ANOVA in the physicochemical parameters evaluation of the soft drink with aromatic herbs (Table 2), indicates that there was a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) between the treatments, for the soluble solid parameters (°Brix) and pH, but there was no significant difference with respect to Vol.  $CO_2$  and acidity ( $p > 0.05$ ).

### °Brix

The mean comparison test for °Brix (figure 1), arranged the results in three ranges, observing that for the  $A_1B_2$  treatment (peppermint

(cuadro 2), indica que existió diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos, para los parámetros sólidos solubles ( $^{\circ}$ Brix) y pH. En el caso de Vol.  $\text{CO}_2$  y acidez no hubo diferencia significativa ( $p > 0,05$ ).

- 2% concentration) the average was of 14.03  $^{\circ}$ Brix, resulting lower than the obtained with the  $\text{A}_2\text{B}_3$  treatment (lemon verbena - 3% concentration) which was 14.20  $^{\circ}$  Brix.

**Cuadro 1. Diseño de los tratamientos evaluados.**

**Table 1. Design of evaluated treatments.**

Trat.	Símbolo	Hierbas aromáticas Factor A	Concentración de hierbas Factor B
1	$\text{A}_1\text{B}_1$	Hierbabuena	1
2	$\text{A}_1\text{B}_2$	Hierbabuena	2
3	$\text{A}_1\text{B}_3$	Hierbabuena	3
4	$\text{A}_2\text{B}_1$	Hierba luisa	1
5	$\text{A}_2\text{B}_2$	Hierba luisa	2
6	$\text{A}_2\text{B}_3$	Hierba luisa	3
7	$\text{A}_3\text{B}_1$	Jengibre	1
8	$\text{A}_3\text{B}_2$	Jengibre	2
9	$\text{A}_3\text{B}_3$	Jengibre	3

**Cuadro 2. Análisis de varianza de la bebida carbonatada.**

**Table 2. Variance Analysis of the soft drink.**

Parámetros evaluados	SC	gl	CM	F	Error	C.V.	p-valor
$^{\circ}$ Brix	0,10	8	0,001	5,51	0,04	0,34	0,0013 **
Acidez	0,21	8	0,03	1,05	0,44	13,97	0,4344 <sup>NS</sup>
pH	0,01	8	2,3E-05	29,14	4,10E-04	0,16	0,0001 **
Vol. $\text{CO}_2$	0,03	8	3,1E-03	1,23	0,0031	2,16	0,3350 <sup>NS</sup>

\*\* =Altamente significativo al 0,05%. NS= No significativo

\*\* = Highly significant at 0.05%. NS = Not significant.

### °Brix

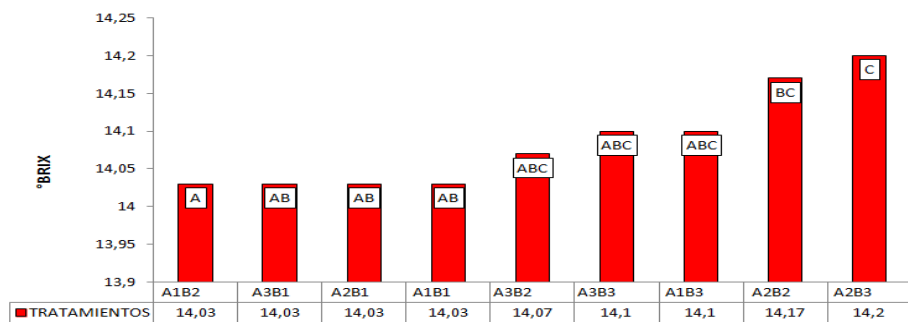
La prueba de comparación de medias para °Brix (figura 1), ordenó los resultados en tres rangos, observándose que para el tratamiento A<sub>1</sub>B<sub>2</sub> (hierbabuena – 2% de concentración) se obtuvo un promedio de 14,03 °Brix resultando más bajo que el obtenido con el tratamiento A<sub>2</sub>B<sub>3</sub> (hierba luisa – 3% de concentración) el cual fue de 14,20 °Brix.

Los resultados obtenidos se encuentran dentro de los parámetros que especifica la Norma INEN 1101:2017 para bebidas carbonatadas, que indica que el nivel máximo de °Brix es 15. Menores valores de °Brix (8°), fueron reportados por Gómez (2014) para una bebida carbonatada tipo infusión a partir de hierba María Luisa (*Lippia triphylla*). Estas diferencias pudieran deberse a que Gómez (2014) utilizó otros porcentajes de azúcar y otra hierba aromática.

The results obtained are within the parameters specified by the INEN 1101: 2017 Standard for carbonated beverages, which indicates that the maximum level of °Brix is 15. Lower values of °Brix (8 °) were reported by Gómez (2014) for a carbonated infusion-type drink made from María Luisa grass (*Lippia triphylla*). These differences could be due to the fact that Gómez (2014) used other percentages of sugar and another aromatic herbs.

### pH

The mean comparison test for pH (figure 3) organized the results in five ranges, in this case, the A<sub>3</sub>B<sub>1</sub> treatment (ginger - 1% concentration) had an average pH of 3.03, resulting lower compared to treatment A<sub>2</sub>B<sub>3</sub> (lemon verbena - 3% concentration) that reached a higher average pH (3.08). The results achieved are within the ranges



**Figura 2. Comparación de promedios de acuerdo a Tukey para °Brix de la bebida carbonatada. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**

**Figure 2. Comparison of averages according to Tukey for °Brix of soft drinks. Means with a common letter are not significantly different ( $p > 0,05$ )**

**pH**

La prueba de comparación de medias para el pH (figura 3) ordenó los resultados en cinco rangos, en este caso, el tratamiento A<sub>3</sub>B<sub>1</sub> (jengibre - 1% de concentración) tuvo un promedio de pH de 3,03 resultando más bajo en comparación con el tratamiento A<sub>2</sub>B<sub>3</sub> (hierba luisa - 3% de concentración) que alcanzó un mayor promedio de pH (3,08). Los resultados obtenidos se encuentran dentro de los rangos que especifica la Norma INEN 1101:2017 para bebidas carbonatadas, en la cual se indica que el nivel mínimo de pH es de 2,0 y el máximo de 4,5. A este respecto, Gómez (2014) reporta valores de pH de 3,5 en una bebida carbonatada tipo infusión a partir de hierba María Luisa, los valores de pH del tratamiento con hierba luisa al 3% se encuentran por encima del rango reportado por este autor, esto puede deberse a que Gómez (2014) no utilizó las mismas hierbas y concentraciones, es decir los valores obtenidos dependen de la formulación de cada bebida.

specified by the INEN 1101: 2017 Standard for carbonated beverages, which indicates that the minimum pH level is 2.0 and the maximum is 4.5. In this regard, Gómez (2014) reports pH values of 3.5 in a carbonated infusion-type drink made with María Luisa grass; With respect to this, the pH values of the treatment with 3% lemon verbena are above the range reported by the author and it may be due to the fact that Gómez (2014) did not use the same herbs and concentrations. The values obtained depends on the formulation for each drink.

**Acidity**

In figure 4, can be seen that for the diverse formulations there were no significant statistical differences for the acidity parameter. However, notes that the A<sub>2</sub>B<sub>3</sub> treatment (lemon verbena - 3% concentration) presented a lower average acidity (1.06) while, the A<sub>3</sub>B<sub>2</sub> treatment (ginger - 2% concentration) had

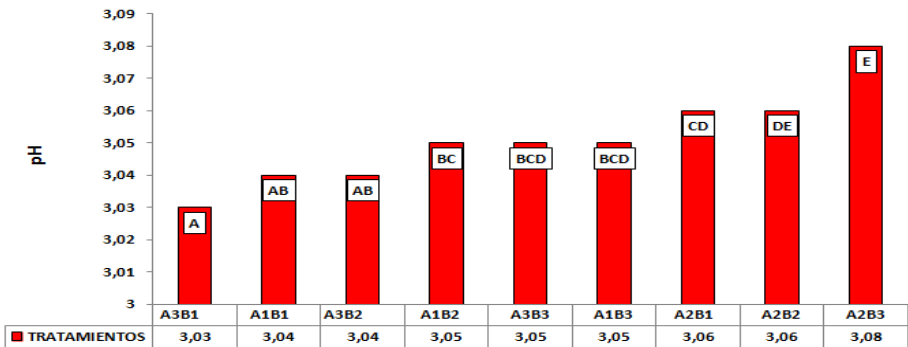


Figura 3. Comparación de media para el pH de la bebida carbonatada. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Figure 3. Comparison of mean for the soft drink pH. Means with a common letter are not significantly different (p> 0.05).



En la figura 4, se evidencia que en las diferentes formulaciones no hubo diferencias estadísticamente diferentes para el parámetro acidez. Sin embargo, se observa que el tratamiento A<sub>2</sub>B<sub>3</sub> (hierba luisa – 3% de concentración) presentó un menor promedio de acidez (1,06) y el tratamiento A<sub>3</sub>B<sub>2</sub> (jengibre – 2% de concentración) 1,36. Estas medias están por encima de los valores permisibles por la Norma INEN 1101:2017 para bebidas carbonatadas, esta norma indica que el valor máximo de acidez es de 0,5. En este sentido, Siler y Morris, (1993) indican que los zumos de frutas carbonatadas contienen valores mayores de acidez titulable. Por otra parte, García *et al.* (2015), reportaron valores mayores a 0,5 %, en pulpa de maracuyá, justificando que dichos resultados se debieron al utilizar frutas que poseen una acidez alta.

(1.36). These means are above the permissible values by the INEN 1101: 2017 Standard for carbonated beverages, where this standard indicates that the maximum acidity value is 0.5. In this sense, Siler and Morris, (1993) indicate that carbonated fruit juices contain higher titratable acidity values. On the other hand, García *et al.* (2015), reported values greater than 0.5%, in passion fruit juice, justifying that these results were due to the use of fruits that have high acidity.

**CO<sub>2</sub> volume**

In figure 5, the determination of the CO<sub>2</sub> volume showed that there were no significant differences (p> 0.05). The numerical variation indicates that the A<sub>3</sub>B<sub>2</sub> treatment (ginger - 2% concentration) presented a lower average volume of CO<sub>2</sub> with a value of 2.5, while for the A<sub>3</sub>B<sub>1</sub> treatment (ginger - 1%

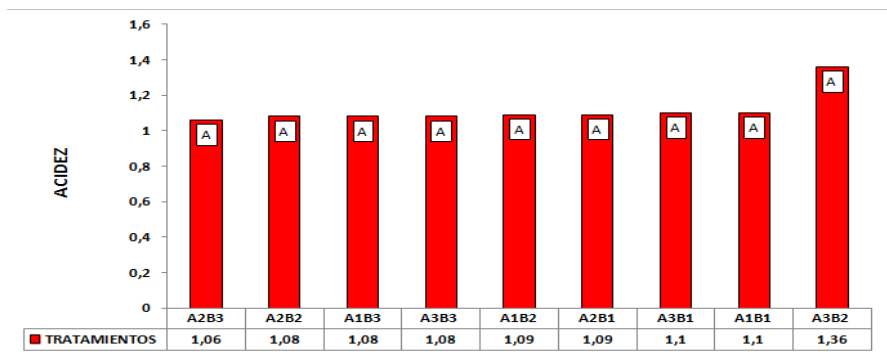


Figura 4. Comparación de promedios de acuerdo a Tukey para la acidez de la bebida carbonatada. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Figure 4. Comparison of averages according to Tukey for the acidity of the carbonated drink. Means with a common letter are not significantly different (p> 0.05).

**Volumen de CO<sub>2</sub>**

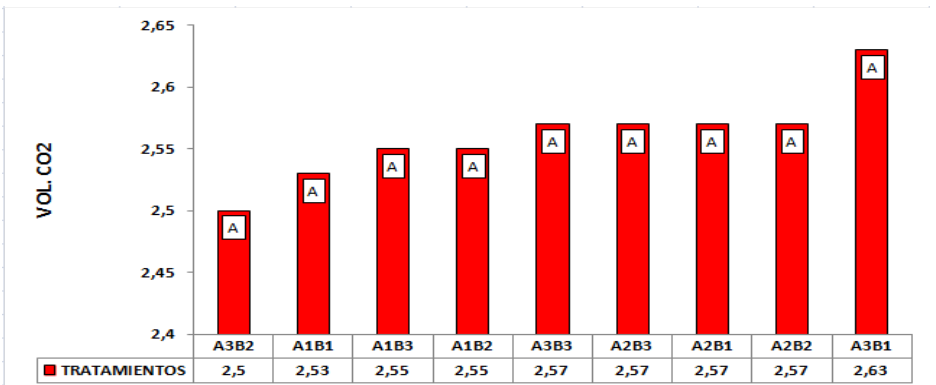
En la figura 5, se muestra que en la determinación del Volumen de CO<sub>2</sub> no existió diferencia significativa (p>0,05). Las diferencias numéricas indican que el tratamiento A<sub>3</sub>B<sub>2</sub> (jengibre – 2% de concentración) presentó un menor promedio de volumen de CO<sub>2</sub> con un valor de 2,5 mientras que para el tratamiento A<sub>3</sub>B<sub>1</sub> (jengibre – 1% de concentración) se obtuvo un promedio más alto con un valor de volumen de CO<sub>2</sub> de 2,63. Estas medias se encontraron dentro de lo permitido por la Norma INEN 1101:2017 para bebidas carbonatadas, la cual indica que el valor mínimo es de uno (1) y el valor máximo es de cinco (5).

concentration) a higher average was obtained with a CO<sub>2</sub> volume value of 2.63. These means were within, what is allowed by the INEN 1101: 2017 Standard for carbonated beverages, which indicates that the minimum value is one (1) and the maximum value is five (5).

According to Steen and Ashurst (2007), carbonated fruit juice drinks generally have an amount of 2.5 volumes of CO<sub>2</sub> equivalent to 5 g CO<sub>2</sub> per liter.

**Sensory analysis**

The results of the Kruskal Wallis test on sensory characteristics (Table 3) showed highly significant differences (p <0.05) concerning flavor. While for the aroma attributes,



**Figura 5. Comparación de promedios de acuerdo a Tukey para el Vol. CO<sub>2</sub> de la bebida carbonatada**

**Figure 5. Comparison of averages according to Turkey for the CO<sub>2</sub> Vol. of the soft drink. Means with a common letter are not significantly different (p> 0.05).**

Según Steen y Ashurst (2007), las bebidas de jugo de frutas carbonatadas generalmente tienen una cantidad de 2,5 volúmenes de CO<sub>2</sub> equivalentes a 5 g CO<sub>2</sub> por litro.

### Análisis sensorial

Los resultados de la prueba de Kruskal Wallis sobre las características sensoriales (Cuadro 3) mostraron diferencias altamente significativas ( $p < 0,05$ ) en el atributo sabor. Mientras que para los atributos aroma, color y apariencia general no se detectaron significancia estadística.

En la figura 6 se detalla la

color and general appearance, no statistical significance was detected.

Figure 6, details the multiple comparison according to the Mann Whitney U tests for the flavor parameter where the statistical significance is evidenced ( $p < 0,05$ ) besides it can be seen that the A<sub>3</sub>B<sub>3</sub> treatment (ginger - 3% concentration) presented the lowest average with a value of 97.50 and treatment A<sub>2</sub>B<sub>1</sub> (lemon verbena - 1% concentration) the highest average with a value of 169.47, which indicates that the tasters exhibited

### Cuadro 3. Prueba de Kruskal Wallis de las características sensoriales de la bebida carbonatada.

Table 3. Kruskal Wallis test to the soft drink sensory characteristics.

Variables	N	gl	H	p-valor
Sabor	30	8	19,97	0,0054 **
Aroma	30	8	3,37	0,8816 NS
Color	30	8	4,60	0,7478 NS
Apariencia general	30	8	4,58	0,7491 NS

\*\*=Altamente significativo al 0,05%. NS= No significativo

\*\* = Highly significant at 0.05%. NS = Not significant.

comparación múltiple según las pruebas de U de Mann Whitney para el parámetro sabor donde se evidencia significancia estadística ( $p < 0,05$ ) y se observa que el tratamiento A<sub>3</sub>B<sub>3</sub> (jengibre - 3% de concentración) presentó el promedio más bajo con un valor de 97,50 y el tratamiento A<sub>2</sub>B<sub>1</sub> (hierba luisa - 1% de concentración) el mayor promedio con un valor de 169,47, lo cual indica que los catadores mostraron mayor aceptabilidad para la bebida elaborada con hierba luisa al 1% de concentración.

greater acceptability for the drink made with lemon verbena at 1% concentration.

### Conclusions

A carbonated passion fruit drink was made with the addition of three aromatic herbs: peppermint, lemon verbena and ginger. The results showed °Brix, pH and CO<sub>2</sub> volume values within the ranges established for the INEN 1101: 2017 Standard



Figura 6. Comparación múltiple según las pruebas de U de Mann Whitney para el atributo sabor. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Figure 6. Multiple comparison according to the Mann Whitney U tests for flavor attribute. Means with a common letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ).

### Conclusiones

Se elaboró una bebida carbonatada de maracuyá con adición de las hierbas aromáticas hierbabuena, hierba luisa y jengibre con valores de °Brix, pH y volumen de CO<sub>2</sub> dentro de los rangos establecidos en la Norma INEN 1101:2017 para bebidas carbonatadas. Mientras que los valores de acidez excedieron los límites permisibles lo cual se debió a la alta concentración de ácidos orgánicos presentes en el maracuyá (materia prima base).

### Literatura citada

Acuña, O. y A, Torres. 2010. Aprovechamiento de las propiedades funcionales del jengibre (*Zigiber officinale* R.) en la elaboración de condimento en polvo, infusión filtrante y aromatizante para quema directa. Rev. Politécnica, 29(1), 60–69.

for carbonated beverages. However, the acidity charge exceeded the permissible limits due to the high concentration of organic acids present in passion fruit (base raw material).

### *End of English Version*

Amaya R. J. 2010. El cultivo del maracuyá (*Passiflora edulis*) form. Flavicarpa. Gerencia Regional Agraria La Libertad, Trujillo-Perú. 30p

Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada M, Robledo C.W. 2017. InfoStat, versión 2017, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Gan, R.-Y., Xu, X.-R., Song, F.-L., Kuang, L., y Li, H.-B. 2010. Actividad antioxidante y contenido fenólico total de plantas medicinales asociado a la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. Rev. de investigación de plantas medicinales, 4 (22), 2438–2444.

- García, C., A. Alvis, y P. Romero. 2015. Aplicación del mapa de preferencia externo en la formulación de una bebida saborizada de lactosuero y pulpa de maracuyá. *Info. Tecnol*, 26 (5), 17–2
- Gómez, M. 2014. Formulación, elaboración y carbonatación de una bebida natural tipo infusión a partir de hierba María Luisa (*Lippia Triphylla*). Doctoral dissertation, Universidad de San Carlos de Guatemala. Disponible en: [http://www.repositorio.usac.edu.gt/1644/1/22T\(532\)A11%20MAYNOR%20MATEO%20TZUN%20G%20C3%93MEZ.pdf](http://www.repositorio.usac.edu.gt/1644/1/22T(532)A11%20MAYNOR%20MATEO%20TZUN%20G%20C3%93MEZ.pdf)
- Alimentos. 2019. Tendencias en bebidas para 2020. Disponible en: <https://www.revistaalimentos.com/ediciones/ed-77-dejamu-una-filosofia-natural/tendencias-en-bebidas-2020/>. Fecha de consulta: 05 Febrero, 2021
- INEC. 2015. Revista de estadísticas y metodologías. Vol. 1. No 1. Disponible en: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/ingreso-y-consumo/>. Fecha de consulta: 10 Mayo, 2020.
- INEN. 2017. Bebidas gaseosas o carbonatadas. Requisitos. Instituto Ecuatoriano de Normalización. (NTE INEN 1101) Cuarta Revisión. Fecha de consulta: 17 Febrero, 2020
- Jardín Botánico. Flora Ibérica. Plantas vasculares de la península ibérica e Islas Baleares. Disponible en: <http://www.floraiberica.es/>. Fecha de consulta: 05 Febrero, 2021.
- Kala, C. P. 2015. Plantas medicinales y aromáticas: una gran ventaja para el desarrollo empresarial. *Rev. de investigación aplicada sobre plantas medicinales y aromáticas*, 2(4), 134–139.
- Kiani, S., S. Minaei, y M. Ghasemi-Varnamkhasi. 2016. Aplicación de sistemas nasales electrónicos para evaluar la calidad de productos vegetales medicinales y aromáticos: una revisión. *Revista de investigación aplicada sobre plantas medicinales y aromáticas*, 3(1), 1–9
- Kregiel, D. 2015. Health safety of soft drinks: contents, containers, and microorganisms. *BioMed Research International*. Vol. 2015, Article ID128697, 15 pages
- Morales, M. L. C., J. M. D. Díaz, D.C. M. Mora, Y. M. M. Pérez y R. E. V. Pérez. 2012. Uso de plantas medicinales en el cuidado de la salud por las familias del municipio de San Gil. *universidad.rev.ciencias salud Unisangil*, 2 (1):16-23
- Muñoz, V. C., M. U. Rovira, V. V. Ibañez, J. M. M. Domínguez, G. R. Blanco, M. U. Rovira y P. Toran. 2020. Consumo de bebidas refrescantes, deportivas y energéticas en adolescentes. *Estudio BEENIS. Anales de Pediatría*, 93(4), 242–25
- Naik, M. I., B. A. Fomda, E. Jaykumar y J. A. Bhat. 2010. Actividad antibacteriana del aceite de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) contra algunas bacterias patógenas seleccionadas. *Revista Asia Pacífico de Medicina Tropical*, 3 (7), 535–538.
- Pabón, L. M. C., S. Turbay, B. Rojano, L. M. Álvarez, S. L. Restrepo, J. M. Álvarez, K. C. Bonilla, C. Ochoa, N. Sánchez. 2011. Algunas especies de *Passiflora* y su capacidad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(4), 354–363.
- Ramírez, R., M. L. Ojeda, M. A. Tordecilla, J. C. Peña y J. F. Meneses. 2016. El consumo regular de bebidas azucaradas incrementa el perfil lipídico-metabólico y los niveles de adiposidad en universitarios de Colombia. *Revista Colombiana de Cardiología*, 23 (1), 11–18.
- Salgado, A., A. García, M. Garriazo y L. E. Correa. 2017. Factores asociados al consumo de bebidas gaseosas en estudiantes de primer año de medicina de la Universidad Ricardo Palma. *Journal of the Faculty of Medicine*, 17 (4), 56-61
- Siler, A. y J. R. Morris. 1993. Quality effects of carbonation and ethyl maltol on Venus and Concord grape juices and their grape apple blends. *Am. J. Enol. Vitic.* 44 (3). 320–326.
- Silva, O. P. y A. S. Durán. 2014. Bebidas azucaradas, más que un simple refresco. *Rev. Chilena de Nutrición*, 41(1), 90–97.

Steen, D. P., y P. R. Ashurst. 2007.  
Carbonated Soft Drinks: Formulation  
and Manufacture: Steen/Carbonated.  
Blackwell Publishing Ltd, 9600  
Garsington Road, Oxford OX4 2DQ,  
UK. 112p

## Influencia del amaranto y semillas de melón en la composición nutricional de una barra energética

Influence of amaranth and melon seeds on the nutritional composition of an energy bar

Influência de sementes de amaranto e melão na composição nutricional de uma barra de energia

Ángel Zambrano Loor\*, José Muñoz Murillo y Cecilia Párraga Álava

Instituto de posgrado-Facultad de Ciencias Zootécnicas-Universidad Técnica de Manabí.  
Correo electrónico: (AZ) [azambrano5436@utm.edu.ec](mailto:azambrano5436@utm.edu.ec),  (JM) [jose.munoz@utm.edu.ec](mailto:jose.munoz@utm.edu.ec),   
(CP) [ramona.parraga@utm.edu.ec](mailto:ramona.parraga@utm.edu.ec). 

### Resumen

Las barras energéticas son consideradas como una alternativa alimenticia saludable debido a las diferentes propiedades que a estas se les atribuye. La investigación tuvo como objetivo evaluar la influencia del amaranto y las semillas de melón en la composición nutricional de una barra energética destinada para el consumo humano. Se utilizó un diseño unifactorial con tres tratamientos T1 (45% amaranto, 15% semillas de melón), T2 (30% amaranto, 30% semillas de melón), T3 (15% amaranto, 45% semillas de melón) para preparar las barras energéticas. A cada una de las formulaciones se le efectuaron análisis proximal de proteína, ceniza, grasa, fibra, humedad, carbohidratos y energía. Se realizó una evaluación sensorial de cada uno de los tratamientos en la que se evaluó los atributos olor, color, sabor, textura y apariencia general; para ello se utilizó un total de 20 panelistas no entrenados. Los resultados fueron analizados con el programa estadístico InfoStat. El análisis proximal muestra que el contenido de proteína, ceniza y fibra fue superior en el tratamiento T2 con un total de 11,03%, 12,59% y 13,43%, respectivamente. Los contenidos de grasas, humedad y energía fueron superiores en el tratamiento T3 con un total de 13,74%, 5,62% y 3820,85%. En tanto, que el mayor contenido de carbohidratos se presentó en el tratamiento T1 con 67,14%. La evaluación de las propiedades organolépticas de sabor, olor, color, textura y apariencia general fue mejor en el tratamiento T3. La inclusión

Recibido: 08-12-2020 • Aceptado: 19-04-2021.

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [azambrano5436@utm.edu.ec](mailto:azambrano5436@utm.edu.ec)

de los diferentes niveles de harina de amaranto y semillas de melón presentaron resultados favorables de las características proximales y sensoriales (color, olor, sabor, textura y apariencia general).

**Palabras clave:** *Amaranthus caudatus*, composición proximal, *Cucumis melo* L. energéticas, evaluación sensorial.

### Abstract

Energy bars are considered a healthy food alternative due to the different properties attributed to them. The research aimed to evaluate the influence of amaranth and melon seeds on the nutritional composition of an energy bar intended for human consumption. A unifactorial design with three treatments T1 (45% amaranth, 15% melon seeds), T2 (30% amaranth, 30% melon seeds), T3 (15% amaranth, 45% melon seeds) was used to prepare the bars. energetic. Proximal analysis of protein, ash, fat, fiber, moisture, carbohydrates, and energy were performed on each of the formulations. A sensory evaluation of each of the treatments was carried out in which the attributes of smell, color, flavor, texture and general appearance were evaluated; A total of 20 untrained panelists were used for this. The results were analyzed with the statistical program InfoStat. The proximal analysis shows that the content of protein, ash and fiber was higher in the T2 treatment with a total of 11.03%, 12.59% and 13.43%, respectively. The fat, moisture and energy contents were higher in the T3 treatment with a total of 13.74%, 5.62% and 3820.85%. While the highest carbohydrate content was presented in treatment T1 with 67.14%. The evaluation of the organoleptic properties of taste, smell, color, texture and general appearance was better in the T3 treatment. The inclusion of the different levels of amaranth flour and melon seeds showed favorable results of the proximal and sensory characteristics (color, smell, flavor, texture and general appearance).

**Key words:** *Amaranthus caudatus*, proximal composition, *Cucumis melo* L. energetic, sensory evaluation.

### Resumo

As barras energéticas são consideradas uma alternativa alimentar saudável devido às diferentes propriedades que lhes são atribuídas. A pesquisa teve como objetivo avaliar a influência das sementes de amaranto e melão na composição nutricional de uma barra energética destinada ao consumo humano. Um planejamento unifatorial com três tratamentos T1 (45% amaranto, 15% sementes de melão), T2 (30% amaranto, 30% sementes de melão), T3 (15% amaranto, 45% sementes de melão) foi usado para preparar as barras energético. Análises proximais de proteína, cinza, gordura, fibra, umidade, carboidratos e energia foram realizadas em cada uma das formulações. Foi realizada uma avaliação sensorial de cada um dos tratamentos em que foram avaliados os atributos cheiro, cor, sabor, textura



e aspecto geral; Um total de 20 painelistas não treinados foram usados para isso. Os resultados foram analisados com o programa estatístico InfoStat. A análise proximal mostra que o teor de proteína, cinza e fibra foi maior no tratamento T2 com um total de 11,03%, 12,59% e 13,43%, respectivamente. Os teores de gordura, umidade e energia foram maiores no tratamento T3 com um total de 13,74%, 5,62% e 3820,85%. Enquanto o maior teor de carboidratos foi apresentado no tratamento T1 com 67,14%. A avaliação das propriedades organolépticas de sabor, cheiro, cor, textura e aparência geral foi melhor no tratamento T3. A inclusão dos diferentes níveis de farinha de amaranto e sementes de melão apresentou resultados favoráveis nas características proximais e sensoriais (cor, cheiro, sabor, textura e aspecto general).

**Palavras-chave:** *Amaranthus caudatus*, composição proximal, *Cucumis melo* L, avaliação sensorial.

## Introducción

Los seres humanos necesitan consumir alimentos que le permitan obtener los nutrientes necesarios para realizar sus actividades diarias, para ello la alimentación debe ser rica en macronutrientes y micronutrientes, debido a que una mala alimentación conlleva a un sin número de problemas, como malnutrición, sobrepeso, obesidad, entre otros (Herrera *et al.*, 2014); esta situación afecta a una de cada tres personas en el mundo, incluidas todas las clases sociales y personas de todas las edades (Hernández *et al.*, 2017).

Las barras de cereales son productos relativamente nuevos, elaborados mediante la aglutinación de diversos ingredientes, son un buen complemento alimenticio consumido por niños, adultos, ancianos y por personas que se someten a esfuerzos físicos intensos y por todos aquellos que desean tener a su alcance un snack saludable rico en micro y

## Introduction

Human needs to consume food that allows them to obtain the necessary nutrients to carry out their daily activities. Diets must be rich in macronutrients and micronutrients due to poor diets could lead to some problems, such as malnutrition, overweight, obesity, among others (Herrera *et al.*, 2014); This situation affects one in three people in the world, what includes people of all ages and social classes (Hernández *et al.*, 2017).

Cereal bars are relatively new products, made mixing sundry ingredients. They are a good food supplement consumed by children and adults who undergo intense physical effort or want to have healthy snack rich in micro and macronutrients that provides the energy and resistance in their daily tasks (Márquez and Pretell, 2018); Its caloric intake is between 100 and 150 calories with around 30 grams per serving without

macro nutrientes que les provea de energía y resistencia en sus labores diarias (Márquez y Pretell, 2018); su aporte calórico está entre 100 y 150 calorías, con una masa de alrededor de 30 gramos por ración sin requerir un gran esfuerzo digestivo (Cappella, 2016).

La difusión y aceptación por la población de las barras de cereales ha sido amplia y el crecimiento de su consumo se ha cuadruplicado en la última década a nivel mundial (Olivera *et al.*, 2009), debido a que su composición nutritiva contribuye a optimizar el rendimiento, pesan poco, son resistentes a altas temperaturas y al frío sin necesidad de un aislante térmico, se deshacen en la boca casi sin esfuerzo y se digieren fácilmente; siendo sus principales componentes hidratos de carbono y fibra alimentaria (Caipo *et al.*, 2015).

En la actualidad existen muchas barras de cereales de bajo aporte nutricional debido a que ciertas marcas solo se basan en las características organolépticas y en la ganancia económica, y no en el contenido nutricional (Sanez, 2016); siendo este el motivo por el cual en los últimos años, diversos investigadores trabajan en el tema, estudiando la incorporación de nuevas materias primas de frutos y semillas de cultivos autóctonos que mejoren la calidad y cantidad del contenido de micro y macro nutrientes e incorporen ácidos grasos esenciales, siendo esto factible en productos de corta duración (Yadav y Bhatnagar, 2017).

El amaranto es un pseudocereal libre de gluten, que aporta grandes

requiriendo a great digestive effort (Cappella, 2016).

The dissemination and acceptance by the population of cereal bars have been wide as well the growth of their consumption has quadrupled in the last worldwide decade (Olivera *et al.*, 2009), owing to their nutritional composition (that contributes to optimizing performance), little weight, and resistance to high and low temperatures without needs a thermal insulator. Additionally, they melt in the mouth effortlessly and digest easily, being its main components carbohydrates and dietary fiber (Caipo *et al.*, 2015).

At present, there are many cereal bars with a low nutritional contribution due to certain brands are only based on organoleptic characteristics and their financial gain, but not on the nutritional content (Sanez, 2016). Consequently, in recent years, various researchers have been working on this subject, studying the new raw materials incorporation from fruits and seeds of native crops to improve the quality and quantity of the micro and macronutrient content that add essential fatty acids, being this feasible in short-lived products (Yadav and Bhatnagar, 2017).

Amaranth is a gluten-free pseudocereal, which provides large amounts of micro and macronutrients. Its protein content ranges are between 14% and 16%, competing favorably with other cereals since none of them exceeds 13% (Algara *et al.*, 2013). Studies indicate that nutritionally is better than many cereals because its protein has double as much lysine

cantidades de micro y macro nutrientes, su contenido proteico oscila entre 14% y 16% compitiendo favorablemente con los demás cereales ya que ninguno supera el 13% (Algara *et al.*, 2013). Estudios indican que nutricionalmente es mejor que muchos cereales, debido a que su proteína presenta el doble de lisina que la del trigo y el triple que la del maíz, aporta todos los aminoácidos esenciales, por lo que se le considera un alimento de proteína completa (Hernández, 2019); asimismo, aporta entre 66,17% a 71,8% de carbohidratos, de 6 a 8% de grasas predominando las poliinsaturadas con 1,66%, fibra de 15 a 16% por cada 100g de semillas y en lo que respeta al contenido de micronutrientes se destacan el hierro y el calcio con 7,59 mg y 153 mg, respectivamente, además poseen alto contenido de ácido fólico, fósforo y zinc (Enaine *et al.*, 2018).

Por otra parte, las semillas de melón tienen un buen contenido de vitaminas A, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, D, E y K entre otras como la tiamina, la niacina y la riboflavina (Ramírez *et al.*, 2016), además aportan cantidades significativas de minerales como calcio, potasio, hierro, magnesio, sodio, cobre, zinc, fósforo, manganeso y selenio, fibra y un alto contenido de proteínas que van desde el 15% hasta el 37% y un 35% de aceites, además de un bajo contenido de grasas no saturadas (Silva *et al.*, 2020).

De acuerdo con lo expuesto anteriormente es necesario el desarrollo de nuevas investigaciones que conlleven a generar alternativas alimenticias que permitan aprovechar las propiedades nutricionales del

as wheat and triple comparing with corn, besides it provides all the essential amino acids, so that is why it is considered a complete protein food (Hernández, 2019); Likewise, it contributes between 66.17% to 71.8% of carbohydrates, 6 to 8% of fats, predominantly polyunsaturated with 1.66%, the fiber of 15 to 16% per 100 g of seeds and regards the content of micronutrients, iron, and calcium stand out with 7.59 mg and 153 mg, respectively. They also have a high content of folic acid, phosphorus, and zinc (Enaine *et al.*, 2018).

On the other hand, melon seeds have a good content of vitamins A, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, D, E, K and others such as thiamine, niacin and riboflavin (Ramírez *et al.*, 2016). They also provide significant amounts of minerals (calcium, potassium, iron, magnesium, sodium, copper, zinc, phosphorus, manganese, and selenium), fiber, high content of proteins ranging from 15% to 37%, and 35% of oils further a low unsaturated fat content (Silva *et al.*, 2020).

Under the above, it is necessary to develop new research that leads to the generation of alternatives foods that allows taking advantage of amaranth and melon nutritional properties. Therefore, this research was developed to evaluate melon seed and amaranth influence on an energy bar nutritional composition.

## Materials and methods

### Energy bars preparation

The research was carried out at the Faculty of Zootechnical Sciences laboratories in the Technical University

amaranto y el melón. Por lo tanto, la investigación se desarrolló con el objetivo de evaluar la influencia del amaranto y las semillas de melón en la composición nutricional de una barra energética.

## Materiales y métodos

### Preparación de las barras energéticas

La investigación fue realizada en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Zootécnicas de la Universidad Técnica de Manabí, Ecuador, usando como materias primas básicas amaranto, avena, quinua y semillas de melón, y como edulcorante miel de abeja. Para elaborar las barras se utilizó amaranto, adquirido en Quito, avena, quinua, semillas de melón y miel de abeja, adquiridos en Portoviejo.

La elaboración se inició con la recolección de las materias primas e insumos, los cuales fueron pesados en una balanza digital (Marca S AFSTAR), de acuerdo a la formulación mostrada en el cuadro 1. Se procedió a mezclar cada uno de los insumos de forma manual en un recipiente limpio y seco; cada uno de los tratamientos se mezcló independientemente según lo establecido (cuadro 1). Seguidamente, se colocó la mezcla en moldes de 30 cm de largo por 15 cm de ancho. Cada una de las formulaciones se sometió a deshidratación (por un tiempo de 115 minutos a una temperatura de 65°C) en un deshidratador eléctrico (Marca Inmegar Dryer 300417, modelo IEF-14), fabricado en Ecuador (35 cm [14"] de tamaño, capacidad de 10 bandejas). Cumplido este proceso se efectuó un

of Manabí, Ecuador, using amaranth, oats, quinoa, and melon seeds as basic raw materials, with honey as a sweetener. Amaranth and oats were extracted from Quito, while quinoa, melon seeds, and honey, were obtained from Portoviejo. These materials were utilized to make the bars.

The preparation began with the collection and supplies of the raw materials, which were weighed on a digital scale (Brand S AFSTAR), according to the formulation shown in Table 1. We proceeded to mix the inputs apiece manually in a dry and clean container, where each one of the treatments was mixed independently as shown (Table 1). Afterward, the mixture was placed in 30 cm long by 15 cm wide molds. Each of the formulations was subjected to dehydration (for a time of 115 minutes at a temperature of 65 ° C) in an electric dehydrator (Inmegar Dryer Brand 300417, model IEF-14), manufactured in Ecuador (35 cm [14"] in size, 10-tray capacity). Once this process was completed, a manual chopping was carried out, dividing units of approximately 25 grams each, which were vacuum packed and later labeled.

### Proximal analysis

Proximal analysis of the three treatments under review was performed; the parameters measured were: moisture (as established in the INEN 518 (1980) standard), ash using the parameters established by the INEN 520 (1980) standard, proteins by the Kjeldahl method, fats by means of the AOAC 922.06 (1980) method, fiber through the INEN 542

troceado manual separando unidades de aproximadamente 25 gramos, las cuales fueron empacadas al vacío y posteriormente etiquetados.

(1980) standard, besides the analysis of carbohydrates was realized by difference and the energy content was carried out by calculation methods.

**Cuadro 1. Formulación en porcentaje (%) de las barras de cereales.**

**Table 1. Formulation in percentage (%) of cereal bars.**

Ingredientes	T1	T2	T3
Amaranto	45	30	15
Semillas de melón	15	30	45
Avena	10	10	10
Quinoa	10	10	10
Glucosa	10	10	10
Miel de abeja	10	10	10

**Análisis proximal**

Se realizó análisis proximal de los tres tratamientos en estudio; los parámetros medidos fueron: humedad según lo establecido en la norma INEN 518 (1980), ceniza mediante los parámetros establecidos por la norma INEN 520 (1980), proteínas mediante el método de Kjeldahl, grasas mediante el método AOAC 922.06 (1980), fibra mediante la norma INEN 542 (1980), además se efectuó el análisis de carbohidratos por diferencia y el contenido de energía mediante métodos de cálculo.

**Análisis sensorial**

Se realizó una prueba de análisis sensorial para determinar el mejor tratamiento mediante una escala hedónica del 1 al 5 (Cuadro 2), siendo uno el más bajo y cinco el más alto, se utilizó un total de 20 panelistas no entrenados entre hombres y mujeres

**Sensory analysis**

A sensory analysis test was performed to determine the best treatment using a hedonic scale from 1 to 5 (Table 2), being number one the lowest and number five the highest. A total of 20 untrained panelists among men and women with an age range between 20 to 50 years old were used. A test and samples of evaluation were given to the panelists, individually, with their glass of water for the mouth rinsing. A quantitative and qualitative assessment was established for each of the treatments as shown in Table 2.

**Experimental design and statistical analysis**

A completely randomized and unifactorial experimental design (DCA) was applied, with three (3) treatments: 40% of raw materials (oats, quinoa, glucose, honey) remained constant in the cereal bars and the other 60%

con un rango de edad entre 20 a 50 años. A cada uno de los panelistas se les entregó el test y las muestras para su evaluación con su respectivo vaso de agua para el enjuague de la boca. Se estableció una valoración cuantitativa y cualitativa para cada uno de los tratamientos como se muestra en el Cuadro 2.

(amaranth and melon seeds) was varied according to the formulation shown in Table 1.

The results of the sensory evaluation of the attributes color, smell, taste, texture and general appearance were processed through an ANOVA analysis of variance using the Infostat program to determine the significant differences

## Cuadro 2. Evaluación de la aceptabilidad.

Table 2. Acceptability Evaluation.

Valor	Grado de aceptabilidad
1	No me gusta
2	Me gusta poco
3	Me es indiferente
4	Me gusta
5	Me gusta mucho

### Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al Azar (DCA), unifactorial con tres (3) tratamientos: el 40% de materias primas (avena, quinua, glucosa, miel de abeja) se mantuvo constante en las barras de cereales y el 60% correspondiente (amaranto y semillas de melón) se varió de acuerdo a la formulación que se muestra en el cuadro 1.

Los resultados de la evaluación sensorial de los atributos color, olor, sabor, textura y apariencia general fueron procesados mediante un análisis de varianza ANOVA usando el programa Infostat; para la determinación de las diferencias significativas se utilizó la prueba de homogeneidad de Tukey con un nivel de significancia del 5%.

where the Tukey homogeneity test was used with a significance level of 5%.

## Results and discussion

### Proximal analysis

Table 3, shows the results of the energy bars proximal analysis, made with three amaranth flour and melon seeds concentrations.

It can be seen, that treatment T2 presented the highest protein content, with a value of 11.03%, followed by treatment T3 with 9.05%. These results are higher than those reported in a study carried out by Yambay and Borbor (2017), where the evaluation of different flour concentrations showed values that fluctuated between 7.40% and 8.12%.

**Resultados y discusión**

**Análisis proximal**

El cuadro 3 muestra los resultados del análisis proximal de las barras energéticas elaboradas con las tres concentraciones de harina de amaranto y semillas de melón.

Regarding the ash content, T2 treatment presents a higher content with a total of 1.69%, different from the T1 and T3 treatments that presented values of 1.34% and 1.53%, respectively.

Regarding fat content, the highest concentration was obtained in the T3

**Cuadro 3. Análisis proximal de las barras energéticas.**

**Table 3. Energy bars proximal analysis.**

Parámetro	Unidad	Tratamientos		
		T1	T2	T3
Proteína	%	8,52	11,03	9,05
Ceniza	%	1,34	1,69	1,53
Grasa	%	9,70	12,59	13,74
Fibra	%	6,73	13,43	10,80
Humedad	%	6,57	5,49	5,62
Carbohidratos	%	67,14	55,77	59,26
Energía	Kcal.kg <sup>-1</sup>	3731,55	3665,68	3820,85

Puede observarse que el tratamiento T2 presentó el mayor contenido de proteínas, con un valor de 11,03 %, seguido del tratamiento T3 con 9,05%. Estos resultados son mayores a los reportados en un estudio realizado por Yambay y Borbor (2017), en la evaluación de diferentes concentraciones de harina, con valores que fluctuaron entre 7,40% y 8,12%.

En cuanto al contenido de ceniza nuevamente el tratamiento T2 presenta un mayor contenido con un total de 1,69 %, diferente a los tratamientos T1 y T2 que presentaron contenidos de 1,34% y 1,53%, respectivamente.

Con respecto al contenido de grasa, la mayor concentración se obtuvo en

treatment with an average of 13.74%, unlike the T2 treatment with an average of 12.59%. These values are higher than those reported by Gómez *et al.* (2016), who reported 10% fat when using 11% amaranth flour.

Concerning fiber content, treatment T2 presented the highest content with 13.43%, followed by treatment T3 with an average of 10.82% and treatment T1 with 6.73% to a lesser extent. These results are within those reported by Yambay and Borbor (2017), who obtained a fiber content of 12.41%, using 43.64% amaranth in their formulation for the energy bars preparation.

The results obtained from the moisture content show a higher value

el tratamiento T3 con una media de 13,74% a diferencia del tratamiento T2 que presentó una media de 12,59%. Estos valores son superiores a los reportados por Gómez *et al.* (2016), quienes reportan un 10% de grasas al utilizar 11% de harina de amaranto.

En la determinación del contenido de fibra, el tratamiento T2 presentó el mayor contenido con un 13,43%, seguido por el tratamiento T3 con una media de 10,82% y en menor cantidad el tratamiento T1 con 6,73%. Estos resultados se encuentran dentro de los reportados por Yambay y Borbor (2017), quienes obtuvieron un contenido de fibra de 12,41%, utilizando 43,64% de amaranto en su formulación para la elaboración de barras energéticas.

Los resultados obtenidos del contenido de humedad, muestran un valor mayor en el tratamiento T1 con una media de 6,57 %, en tanto que en los tratamientos T2 y T3 la humedad fue menor con un total de 5,49% y 5,62%. Estudios realizados por Salazar *et al.* (2015), en la elaboración de barras energéticas con la inclusión de harina de amaranto muestran un contenido de humedad de 7,00%, ubicándose los resultados obtenidos dentro de los requisitos establecido por la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2595 (2011), en la cual se establece un máximo de humedad de 10%.

Los resultados obtenidos con respecto al contenido total de carbohidratos totales, muestra que el tratamiento T1 presentó la mayor concentración con 67,14%, seguido del tratamiento T3 con una media de 59,26%, estos resultados están

in treatment T1 with an average of 6.57%, while in treatments T2 and T3 the humidity was lower with a total of 5.49% and 5.62 %. Studies conducted by Salazar *et al.* (2015), in the energy bars elaboration with the inclusion of amaranth flour show a moisture content of 7.00%, placing the results obtained within the requirements established by the Ecuadorian Technical Standard INEN 2595 (2011), in the which establishes a maximum humidity of 10%.

The results obtained for the total carbohydrates content show that treatment T1 presented the highest concentration with 67.14%, followed by treatment T3 with an average of 59.26%, these results are given by the contribution of carbohydrates in amaranth flour. Higher carbohydrate contents (71.1%) were obtained by Cuellar *et al.* (2019), using amaranth in conjunction with soy flour.

Regarding energy content, the T3 treatment presented the highest content value with a total of 3820.85 Kcal.100g<sup>-1</sup> while for the T1 treatment 3731.55 Kcal.100g<sup>-1</sup> was obtained. Taking in mind this Velastigui (2016), reports a lower total energy content (432.43 Kcal. 100g<sup>-1</sup>), in the preparation of a nutritional bar with moringa, quinoa, and amaranth.

According to the authors of this work, the use of melon seeds in the energy bars elaboration has not been documented. However, other investigations such as those carried out by Zenteno, (2014) and Arruti *et al.* (2015), reports the inclusion of different fruits and grains in the formulation of energy bars that has shown favorable results regarding



dados por el aporte de carbohidratos disponibles en la harina de amaranto. Mayores contenidos de carbohidratos (71,1%) fueron obtenidos por Cuellar *et al.* (2019), utilizando amaranto en conjunto con harina de soya.

En cuanto al contenido de energía, el tratamiento T3 presentó el mayor contenido con un total de 3820,85 Kcal.100g<sup>-1</sup> en tanto que para el tratamiento T1 se obtuvo 3731,55 Kcal.100g<sup>-1</sup>. Por su parte, Velastigui (2016), reporta un contenido total de energía menor (432,43 Kcal.100g<sup>-1</sup>), en la elaboración de una barra nutricional con moringa, quinua y amaranto.

Según concierne a los autores de este trabajo, la utilización de las semillas de melón en la elaboración de barras energéticas no se encuentra documentada, sin embargo, otras investigaciones como las realizadas por Zenteno, (2014) y Arruti *et al.* (2015), reportan que la inclusión de diferentes frutos y granos en la formulación de la barras energéticas ha mostrado resultados favorables en cuanto a las características sensoriales, bromatológicas y fisicoquímicas del producto final.

### **Análisis sensorial**

Los resultados del análisis sensorial de las variables sabor, olor, color, textura y apariencia general en las barras elaboradas con las diferentes formulaciones se presenta en el cuadro 4.

Los resultados de la evaluación sensorial de las variables sabor, olor, color, textura y apariencia general presentaron diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) entre cada uno de los tratamientos en estudio.

the sensory, bromatological and physicochemical characteristics of the final product.

### **Sensory analysis**

The results for the sensory analysis of the variables flavor, odor, color, texture, and general appearance in the bars made with the different formulations are presented in Table 4.

The results for the sensory evaluation of the variables taste, smell, color, texture, and general appearance showed significant differences ( $p < 0.005$ ) between each of the treatments under study.

Regarding flavor attributes, significant differences were presented in treatments T2 and T3 compared to treatment T1. In this case, the best score was presented by the T3 treatment with a mean of  $4.40 \pm 0.50$ .

For color attribute, the results showed significant differences between treatments under study, being T1 different concerning the valuations obtained for this property. Variance analyzes showed that the best acceptance was presented in treatment T3 with a mean of  $4.45 \pm 0.51$ , similar to treatment T2 with a mean of  $4.10 \pm 0.64$ . The lowest acceptance results were presented in treatment T1 with a mean of  $3.50 \pm 0.69$ , while the best acceptance was presented in treatment T3  $4.60 \pm 0.60$ .

The bars' texture showed significant differences ( $p < 0.005$ ) between the T3 treatment and the other treatments under study. In this case, the best score was presented in treatment T3, reaching a score of  $4.61 \pm 0.50$ .

The variance analysis of the general appearance showed significant

Con respecto al atributo sabor las diferencias significativas se presentaron en los tratamientos T2 y T3 con respecto al tratamiento T1. En este caso la mejor puntuación la presentó el tratamiento T3 con una media de  $4,40 \pm 0,50$ .

differences between the treatments T1 and T3, while treatment T1 was not different compared to the other treatments. For this variable, treatment T3 was the one that presented the best acceptance, with a mean of  $4.60 \pm 0.50$ .

#### Cuadro 4. Evaluación sensorial de los tratamientos en estudio.

**Table 4. Sensory evaluation of the treatments under study.**

Tratamientos	Sabor	Olor	Color	Textura	A. General
T1	3,40±0,88 <sup>a</sup>	3,60±0,68 <sup>a</sup>	3,50±0,69 <sup>a</sup>	3,75±0,79 <sup>a</sup>	3,70±0,80 <sup>a</sup>
T2	4,10±0,72 <sup>b</sup>	4,10±0,64 <sup>b</sup>	4,05±0,60 <sup>b</sup>	4,10±0,64 <sup>a</sup>	4,15±0,67 <sup>ab</sup>
T3	4,40±0,50 <sup>b</sup>	4,45±0,51 <sup>b</sup>	4,60±0,60 <sup>c</sup>	4,61±0,50 <sup>b</sup>	4,60±0,50 <sup>b</sup>
<b>Sig. Tukey</b>	0,0002	0,0002	0,0001	0,0006	0,0004

Medias con una letra en común no son diferentes ( $p > 0,09$ ).

Means with a letter in common are not different ( $p > 0.09$ ).

Para el atributo color los resultados mostraron diferencias significativas entre tratamientos siendo T1 diferente en cuanto a las valoraciones obtenidas en esta propiedad. Los análisis de varianza muestran que la mejor aceptación se presentó en el tratamiento T3 con una media de  $4,45 \pm 0,51$  similar al tratamiento T2 con una media de  $4,10 \pm 0,64$ . En lo que respecta al color los resultados muestran diferencias significativas entre cada una de los tratamientos en estudio. Los resultados de la menor aceptación se presentaron en el tratamiento T1 con una media de  $3,50 \pm 0,69$  en tanto que la mejor aceptación se presentó en el tratamiento T3  $4,60 \pm 0,60$ .

La textura de las barras nutricionales presentó diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) entre el

In a study carried out by Yambay and Borbor (2017), the evaluation of the different concentrations of amaranth with pigeon pea showed that by increasing the concentrations of amaranth flour, the tasters reported a greater preference in acceptance in the variables color, smell, texture, and flavor.

On the other hand, Dias and Gomes (2010) reported scores of 6.7 to 8 on a 9-point assessment scale in the sensory characteristics evaluation (general appearance, texture, and flavor) of amaranth nutritional bars with different types of fruits.

#### Conclusions

Nutritional bars were made with the inclusion of amaranth flour and melon seeds different proportions

tratamiento T3 con los demás tratamientos en estudio. En este caso la mejor puntuación se presentó en el tratamiento T3 alcanzando una puntuación de  $4,61 \pm 0,50$ .

Los análisis de varianza de la apariencia general mostraron diferencias significativas entre los tratamientos T1 y T3, en tanto que el tratamiento T1 no fue diferente con los demás tratamientos. Para esta variable el tratamiento T3 fue el que mejor aceptación presentó, con una media de  $4,60 \pm 0,50$ .

En un estudio realizado por Yambay y Borbor (2017), en la evaluación de diferentes concentraciones de amaranto con guandul, reportan que, al aumentar las concentraciones de harina de amaranto, los catadores mostraron una mayor preferencia en la aceptación, en las variables color, olor, textura y sabor.

Por otra parte, Dias y Gomes (2010), reportaron puntuaciones de 6,7 a 8 sobre una escala de valoración de 9 puntos, en la evaluación de las características sensoriales (apariencia general, textura y sabor) de barras nutricionales de amaranto con diferentes tipos de frutos.

## Conclusiones

Se elaboraron barras nutricionales con la inclusión de diferentes proporciones de harina de amaranto y semillas de melón con resultados favorables en las características proximales (altos contenidos de proteína, cenizas, fibras y adecuados contenidos de grasa, humedad y energía) y sensoriales (color, olor, sabor, textura

with positive results in the proximal characteristics (high protein, ash, fiber and adequate fat quantity, moisture and energy content) and sensory (color, odor, flavor, texture and general appearance). With this in mind, is considered as an alternative that allows its use in the agri-food industry.

The energy bar made with amaranth flour (15%) and melon seeds (45%) obtained the highest acceptance in the attributes color, smell, taste, texture, and general appearance, taking place in the “I like it”, “I like it a lot” classifications for what its inclusion exerts a positive influence on the sensory quality of the elaborated product.

## *End of English Version*

y apariencia general), por lo que su uso como fuente potencial de nutrientes es considerado como una alternativa que permite su aprovechamiento en la industria agroalimentaria.

La barra energética elaborada con harina de amaranto (15%) y semillas de melón (45%) obtuvo la mayor aceptación en los atributos color, olor, sabor, textura y apariencia general, ubicándose en la clasificación me gusta, me gusta mucho, por lo que su inclusión ejerce una influencia positiva en la calidad sensorial del producto elaborado.

## Literatura citada

- Algara, P., J. Gallegos, y J. Reyes. 2013. Amaranto: Efectos en la nutrición y la salud. *Tlatemoani*, 12: 1-21.
- Arruti, I., M. Fernández, y R. Martínez. 2015. Diseño y desarrollo de una

barra energética para deportistas de triatlón. Enfermería: cuidados humanizados, 4 (1): 27-31.

- Caipo, Y., A. Gutiérrez, y A. Julca. 2015. Optimización por diseño de mezclas de la aceptabilidad de una barra energética a base de quinua (*Chenopodium quinoa*), kiwicha (*Amaranthus caudatus*) y cañihua (*Chenopodium pallidicaule*) evaluada en niños. *Agroind Sci*, 5 (1): 61-67.
- Cappella, A. 2016. Desarrollo de barra de cereal con ingredientes regionales, saludable nutricionalmente. [Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Cuyo]. Obtenido de Repositorio BDIGITALUNCU. [https://tesisenfermeria.bdigital.uncu.edu.ar/objetos\\_digitales/8188/tesis-brom.-cappella-agostina-24-10-16.pdf](https://tesisenfermeria.bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/8188/tesis-brom.-cappella-agostina-24-10-16.pdf)
- Cuellar, R., Aguilar, A., Álvarez, N., y Leines, D. 2019. Barra nutritiva a base de vegetales y cereales. *TECTZAPIC*, 5(2): 99-110.
- Dias, V., y J. Gomes. 2010. Barras de amaranto enriquecidas con fructanos: aceptabilidad e valor nutricional. *Arch Latinoam Nut*, 60 (3): 291-297. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Jose\\_Areas/publication/51167400\\_Amaranth\\_bars\\_enriched\\_with\\_fructans\\_Acceptability\\_and\\_nutritional\\_value/links/02bfe5108108f86098000000/Amaranth-bars-enriched-with-fructans-Acceptability-and-nutritional-value.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Jose_Areas/publication/51167400_Amaranth_bars_enriched_with_fructans_Acceptability_and_nutritional_value/links/02bfe5108108f86098000000/Amaranth-bars-enriched-with-fructans-Acceptability-and-nutritional-value.pdf)
- Enaine, A., A. Hernández, R. Méndez. 2018. Galleta de harina de moringa (*Moringa oleifera* Lam) y amaranto (*Amaranthus caudatus*). [Tesis de pregrado, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas Facultad de Ciencias de la Nutrición y Alimentos]. Disponible en: <https://bit.ly/3kp8ONU>
- Gómez, G., V. Gómez, C. Pérez, y C. Chávez. 2016. Desarrollo de una barra nutritiva a partir de cereales y leguminosas: análisis proximal y sensorial. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1 (1): 798-800.
- Hernández, L. 2019. Desarrollo de una formulación en polvo a base de Amaranto (*Amaranthus cruentus*) y canela (*Cinnamomum sp*) sabor chocolate. [Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona]. Disponible en: <https://ddd.uab.cat/record/213636>
- Hernández, T., M. Rodríguez y C. Giménez. 2017. La malnutrición un problema de salud global y el derecho a una alimentación adecuada. *RIECS*, 2(1): 3-11.
- Herrera, F., D. Betancur, y M. Segura. 2014. Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad; péptidos biológicamente activos. *Nutr. Hosp*, 29(1): 10-20.
- Márquez, L., C. Pretell. 2018. Evaluación de características de calidad en barras de cereales con alto contenido de fibra y proteína. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 16(2): 69-78.
- Norma Técnica Ecuatoriana INEN 518 ([NTE INEN]. 1980. Determinación de humedad en harinas de origen vegetal. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Quito, Ecuador.
- Norma Técnica Ecuatoriana INEN 520 ([NTE INEN]. 1980. Determinación de cenizas en harinas de origen vegetal. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Quito, Ecuador.
- Norma Técnica Ecuatoriana INEN 542 ([NTE INEN]. 1980. Determinación de fibra cruda en harinas de origen vegetal. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Quito, Ecuador.
- Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2595 ([NTE INEN]. 2011. Granolas requisitos. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Quito, Ecuador.
- Official Methods of Analysis of the AOAC. 1980. 13th Edition; Washington D.C., USA Association of Official Analytical Chemists.
- Olivera, M., S. Giacomino, N. Pellegrino, y M. Sambucetti. 2009. Composición y perfil nutricional de barras de cereales comerciales Nutrient Profile and Composition of Store-Bought Cereal Bars. *Actualización en NUTRICIÓN*, 10(4): 275-284.






- Ramírez, J., A. Herrera, C. Aguirre, J. Covarrubias, G. Iturriaga, y J. Raya. 2016. Caracterización de las proteínas de reserva y contenido mineral de semilla de melón (*Cucumis melo* L), Rev. Mex. Cienc. Agrí, 7 (7): 1667-1678.
- Salazar, D., L. Acurio, L. Pérez, A. Valencia, y C. Peñafiel. 2015. Efecto de la utilización de emulsificantes en la textura de barras energéticas de amaranto. Alimentos Hoy, 23(36): 97-111.
- Sanez, Y. 2016. Propuesta para mejorar la calidad de los procesos de elaboración de los productos miel procesada y barras energéticas de la Empresa Coraca-Ri. [Tesis doctoral, Universidad Mayor de San Andrés].
- Silva, M., T. Albuquerque, R. Alves, B. Oliveira, y H. Costa. 2020. Melón (*Cucumis melo* L.) by-products: Potential Food ingredients for novel functional foods. Trends in Food Science & Technology, 98: 181-189.
- Velastigui, A. 2016. Desarrollo de un alimento Nutritivo y Energético tipo barra a partir de Moringa, Quinoa y Amaranto. [Tesis de Maestría, Universidad de Guayaquil ]. Disponible en: <https://bit.ly/34lMnDK>
- Yadav, L., y V. Bhatnagar. 2017. Effect of legume supplementation on physical and textural characteristics of ready to eat cereal bars. J. Dairy Sci, 36(3): 246-250.
- Yambay, W., y S. Borbor. 2017. Evaluación de barras energéticas enriquecidas con Guandul (*Cajanus cajan*) y Amaranto (*Amaranthus caudatus*). SATHIRI, 12(2): 9-23.
- Zenteno, S. 2014. Barras de cereales energéticas y enriquecidas con otras fuentes vegetales. Revista de Investigación Universitaria, 3(2): 58-66.

## Cinética del secado de las hojas de las especies *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) y *Melampodium divaricatum* (Asteraceae)

Leaves drying kinetics of the species *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) and *Melampodium divaricatum* (Asteraceae)

Cinética da secagem das folhas das espécies *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) e *Melampodium divaricatum* (Asteraceae)

Enrique Ruiz Reyes<sup>1\*</sup>, Ricardo Baquerizo-Crespo<sup>2</sup>, Michael Aníbal Macías Pro<sup>3</sup>, María José Pin Molina<sup>4</sup> y Yesther Marisol Pita Gavilanes<sup>4</sup>

Universidad Técnica de Manabí, Av. Urbina y Che Guevara, CP 130105, Portoviejo, Manabí, Ecuador. <sup>1</sup>Instituto de Ciencias Básicas. Correo electrónico: [enrique.ruiz@utm.edu.ec](mailto:enrique.ruiz@utm.edu.ec), . <sup>2</sup>Departamento de Procesos Químicos, Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas. Correo electrónico: [ricardo.baquerizo@utm.edu.ec](mailto:ricardo.baquerizo@utm.edu.ec), . <sup>3</sup>Laboratorio de Análisis Químicos y Biotecnológicos. Instituto de Investigación. Correo electrónico: [michael.macias@utm.edu.ec](mailto:michael.macias@utm.edu.ec), . <sup>4</sup>Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas. Correo electrónico: (MP) [mariajosepinmolina0107@gmail.com](mailto:mariajosepinmolina0107@gmail.com),  (YP) [yesthermarisolpitagavilanes@gmail.com](mailto:yesthermarisolpitagavilanes@gmail.com) .

### Resumen

El estudio del secado de las plantas es importante para los métodos de extracción de los principios activos, ya que brinda beneficios tanto para la eficiencia como para la estabilidad de los mismos. El objetivo de la presente investigación es estudiar la cinética de secado de las hojas de las especies *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) y *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) de la provincia de Manabí. Se emplearon 8 modelos empíricos derivados de la ley de Fick con ajuste y el software STATISTICA como modelador. El modelo se realizó mediante la aplicación de la curva de ajuste de ORIGIN Pro. Los resultados de la cinética fueron obtenidos experimentalmente en un secador de túnel a escala de laboratorio con una temperatura de 40°C, a 1 atm de presión y una velocidad de aire de 8,47 m.s<sup>-1</sup>. Para la determinación del modelo que

Recibido: 29-01-2020 • Aceptado: 31-03-2021.

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [enrique.ruiz@utm.edu.ec](mailto:enrique.ruiz@utm.edu.ec)

mejor se ajusta a los datos experimentales se apoya en el coeficiente de correlación ( $R^2$ ), error cuadrático medio ( $E_{\text{RMS}}$ ) y chi-cuadrado ( $X^2$ ). El modelo matemático que mejor describe el proceso de secado es el logarítmico para *Zanthoxylum sprucei* y el modelo de Wang y Singh para *Melampodium divaricatum*.

**Palabras claves:** Extracción de humedad, cinética de secado, modelos matemáticos, ley de Fick.

### Abstract

The study of the drying of the plants is important for the extraction methods of the active principles, since it provides benefits both for the efficiency and for the stability. The objective of this research is to study the drying kinetics of the leaves of *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) and *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) species from the Manabí province. Eight empirical models derived from Fick's law with adjustment and the STATISTICA software as modeler was used. The model was made by applying the ORIGIN Pro fit curve. The kinetic results were obtained experimentally in a laboratory scale tunnel dryer with a temperature of 40°C, at 1 atm of pressure and a speed air of 8.47 m.s<sup>-1</sup>. To determine the model that best fits the experimental data, it relies on the correlation coefficient ( $R^2$ ), mean square error (ERMS) and chi-square ( $X^2$ ). The mathematical model that best describes the drying process is the logarithmic for *Zanthoxylum sprucei* and the Wang and Singh model for *Melampodium divaricatum*.

**Keywords:** Moisture extraction, drying kinetics, mathematical models, Fick's law.

### Resumo

O estudo da secagem das plantas é importante para os métodos de extração dos princípios ativos, pois proporciona benefícios tanto pela sua eficiência quanto pela sua estabilidade. O objetivo desta pesquisa é estudar a cinética de secagem das folhas das espécies *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) e *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) da província de Manabí. São utilizados 8 modelos empíricos derivados da lei de Fick com posterior ajuste e o software STATISTICA como modelador. O modelo é feito aplicando-se a curva de ajuste ORIGIN Pro. Os resultados cinéticos são obtidos experimentalmente em um secador de túnel em escala de laboratório com temperatura de 40 °C, a 1 atm de pressão e velocidade do ar 8,47 m.s<sup>-1</sup>. Para determinar o modelo que melhor se ajusta aos dados experimentais, ele se baseia no coeficiente de correlação ( $R^2$ ), erro quadrático médio (ERMS) e qui-quadrado ( $X^2$ ). O modelo matemático que melhor descreve o processo de secagem é o logarítmico para *Zanthoxylum sprucei* e o modelo de Wang e Singh para *Melampodium divaricatum*.

**Palavras-chave:** Extração de umidade, cinética de secagem, modelos matemáticos, lei de Fick.

## Introducción

La etnobotánica tiene como objetivo la búsqueda del conocimiento y rescate del saber botánico tradicional, particularmente relacionado al empleo de la flora (Fernández *et al.*, 2012). En el Ecuador existe una gran variedad de plantas silvestres las cuales cuentan con un extenso uso medicinal (Salibová, 2021). En este sentido el estudio preliminar fitoquímico del contenido fenólico total y la actividad antibacteriana de trece especies nativas del país (Rondón *et al.*, 2018), muestra como transformar el conocimiento tradicional en científico.

Las especies vegetales *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) y *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) crecen en América del Sur y se emplean como plantas medicinales para combatir distintas enfermedades. La *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) es conocida popularmente como flor de caléndula falsa, amarilla pequeña estrella, o flor dorada (Lorenzi, 2008). El té de sus hojas e inflorescencias se usa comúnmente en medicina popular (Adegbite *et al.*, 2019). También toda la planta es empleada popularmente como curativa, diaforética (Neto y Chagas, 2001), diurética y en el tratamiento de la leucorrea (Agra *et al.*, 2007). Es nativa de América del Sur y es una especie de maleza moderadamente frecuente en casi todo el país, donde infesta principalmente cultivos anuales, huertos, cafetales y bordes de carreteras (Lorenzi, 2008). Además, en Brasil investigadores publican la actividad antibacteriana

## Introduction

The objective of ethnobotany is the search for knowledge and rescue of the traditional botanical knowledge, particularly related to the use of flora (Fernández *et al.*, 2012). In Ecuador, there is a big variety of wild plants, which have an extensive medicinal use (Salibová, 2021). In this sense the preliminary phytochemical study of the total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species of the country (Rondón *et al.*, 2018), shows how to transform traditional knowledge into scientific.

The plant species of *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) and *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) grow in South America and they are used as medicinal plants to combat various diseases. *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) is popularly known as false marigold flower, small yellow star, or golden flower (Lorenzi, 2008). The tea of its leaves and inflorescences is commonly used in folk medicine (Adegbite *et al.*, 2019). Also all the plant is popularly used as curative, diaphoretic (Neto and Chagas, 2001), diuretic and in the treatment of leucorrhea (Agra *et al.*, 2007). It is native from South America and is a moderately frequent weed species in most of the country, where it mainly infests annual crops, orchards, coffee plantations and roadsides (Lorenzi, 2008). In addition, in Brazil, researchers publish the antibacterial and antileishmanial activity of essential oils from *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) (Pelissari *et al.*, 2010; Moreira, *et al.*, 2019).



y antileishmanial de los aceites esenciales de la *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) (Pelissari *et al.*, 2010; Moreira, *et al.*, 2019).

Binutu y Cordell (2000), estudian los constituyentes químicos de las hojas de las especies *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) y reportan distintos tipos de actividades biológicas como son: larvicida, antiinflamatorias, analgésicas, antioxidante, anticancerígena, antimicrobiano y antifúngico (Tiwary *et al.*, 2007). Además, (Graham *et al.*, 2003) reportan la evaluación antimicrobiana de las hojas de esta especie en Perú, y aíslan el triterpeno lupeol y la sesamina flavanona responsables de esta actividad.

Para el procesamiento de especies vegetales es imprescindible el secado, que es un método de conservación basado en la disminución de la humedad para prolongar su período de vida útil (García *et al.*, 2007). Otras ventajas del mismo son la reducción de peso y volumen, lo cual facilita el transporte y almacenamiento (Helen *et al.*, 2003).

De acuerdo a Can (2000) el proceso de secado se realiza en dos etapas, en la primera etapa, el material se encuentra puro y la operación ocurre en la superficie del material a una velocidad constante. La masa del agua evaporada no es afectada por las condiciones del material. En la segunda etapa, la velocidad de secado decrece debido a que se extrae humedad contenida en el interior de la materia. Esta etapa está delimitada por las propiedades del material.

Binutu and Cordell (2000), study the chemical constituents of the leaves of *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) species, and they report different types of biological activities such as larvicidal, anti-inflammatory, analgesic, antioxidant, anticancer, antimicrobial and antifungal (Tiwary *et al.*, 2007). In addition, (Graham *et al.*, 2003) report the antimicrobial evaluation of the leaves of this species in Peru, and isolate the triterpene lupeol and sesamin flavanone responsible for this activity.

For the processing of plant species, the drying is essential, which is a preservation method based on the reduction of humidity to prolong their useful life (García *et al.*, 2007). Other advantages of it, is the reduction of weight and volume, which facilitates transport and storage (Helen *et al.*, 2003).

According to Can (2000) the drying process is made in two stages, in the first stage, the material is pure and the operation occurs on the surface of the material at a constant speed. The mass of the evaporated water is not affected by the material conditions. In the second stage, the drying speed decreases due to the moisture contained inside the material is extracted. This stage is delimited by the properties of the material.

For the design of the drying operation, the speed with which moisture is extracted from a material is analyzed; this is made through a kinetic study. Through the drying kinetics, the curves are obtained and they relate the moisture of the material with time and other variables

Para el diseño de la operación de secado se analiza la velocidad con la que se extrae la humedad de un material, esto se realiza por medio del estudio cinético. Por medio de la cinética de secado se obtienen curvas que relacionan la humedad de la materia con el tiempo y otras variables como temperatura, tamaño de partículas, entre otras, lo cual permite realizar el diseño o la selección del sistema de secado (Bellagha *et al.*, 2002).

En la actualidad existen herramientas tecnológicas que mediante modelos definidos que se derivan generalmente de la ley de enfriamiento de Newton y la segunda ley de difusión de Fick (Kumar *et al.*, 2012). Estos modelos cuantifican la humedad presente en la materia durante el proceso de secado (Erbay y Icier 2010); la literatura especializada presenta varios ejemplos de estudios cinéticos de secado: café pergamino (Rattanamechaiskul, 2020), yerba mate (Holowaty *et al.*, 2018), romero (Ali *et al.*, 2020) y ortiga y menta (Kaya y Aydın, 2009). Los objetivos de los estudios cinéticos son variados: evaluar coeficientes térmicos para la disminución de costos de operación, comparar métodos de secado a partir de la evaluación de cambios en las propiedades de las especies vegetales y evaluar constantes cinéticas (Arslan y Özcan, 2008).

Se planteó el objetivo de analizar la cinética de secado de las hojas de las especies *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) y *Melampodium divaricatum* (Asteraceae), debido a su potencial biotecnológico, considerándose la importancia del secado en la conservación de estas especies vegetales.

such as temperature, particle size, among others, which allows to perform the design or selection of the drying system (Bellagha *et al.*, 2002).

Currently, there are technological tools that use defined models generally derived from Newton's cooling law and Fick's second diffusion law (Kumar *et al.*, 2012). These models quantify the moisture present in the material during the drying process (Erbay and Icier 2010); the specialized literature presents several examples of drying kinetic studies: parchment coffee (Rattanamechaiskul, 2020), yerba mate (Holowaty *et al.*, 2018), rosemary (Ali *et al.*, 2020) and nettle and mint (Kaya and Aydın, 2009). The objectives of kinetic studies are varied: to evaluate thermal coefficients for decreasing operating costs, to compare drying methods from the evaluation of changes in plant species properties, and to evaluate kinetic constants (Arslan and Özcan, 2008).

The objective was to analyze the drying kinetics of the leaves of *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) and *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) species, due to their biotechnological potential, considering the importance of drying in the conservation of these plant species.

## Materials and methods

### Obtaining and adequacy of the sample

Leaves of *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) and *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) species were manually collected at the Botanical Garden of the Technical

## Materiales y métodos

### Obtención y Adecuación de la muestra

Se recolectaron manualmente hojas de las especies *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) y *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) en el Jardín Botánico de la Universidad Técnica de Manabí ubicado en la ciudad de Portoviejo, Ecuador. Se limpió el polvo, suciedad e impurezas que había en las muestras recolectadas, luego se procedió a separar las hojas de las flores y el tallo de las plantas.

### Secado de las muestras

Para el secado se utilizó un secador de túnel a escala de laboratorio, a una temperatura constante de 40°C, previsto de un soplador de ¼ HP para forzar el aire de secado con una velocidad constante de 8,47 ms<sup>-1</sup>, con flujo radial. Un sistema de calefacción de dos resistencias de 110 V recubiertas de acrílico ubicadas a lo largo del túnel de secado; sistema de control automático de temperatura, una bandeja de acero inoxidable de medidas 10 cm x 20 cm x 5 cm. Para medir la variación de peso se empleó una balanza analítica (SARTORIUS-WERKE GMBH tipo 2245) con precisión de 0,001 g y un cronómetro para controlar el tiempo de secado.

Posteriormente, se colocaron las muestras en la bandeja de acero del secador, previo ajuste de la temperatura del equipo. Durante el proceso de secado las muestras son pesadas en intervalos de 5 min. durante los primeros 50 min.

University of Manabí located in the city of Portoviejo, Ecuador. The dust, dirt and impurities that were in the collected samples were cleaned, and then the leaves of the flowers and the stem of the plants were separated.

### Drying of the samples

For drying, a laboratory-scale tunnel dryer was used, at a constant temperature of 40°C, equipped with a ¼ HP blower to force the drying air at a constant speed of 8.47 ms<sup>-1</sup>, with radial flow. A heating system of two 110 V acrylic coated heating elements located along the drying tunnel; an automatic temperature control system, a stainless steel tray measuring 10 cm x 20 cm x 5 cm. An analytical balance (SARTORIUS-WERKE GMBH type 2245) with an accuracy of 0.001 g and a stopwatch to control the drying time were used to measure the weight variation.

Later, the samples were placed on the steel tray of the dryer, after adjusting the temperature of the equipment. During the drying process, the samples were weighed at intervals of 5 min, during the first 50 min of drying and then 3 measurements were made at 100, 150 and 200 min. The gravimetric method was used for moisture determination. At each time interval the sample was weighed and compared with the previous weighing, determining the final drying point when there was no weight variation. This procedure was applied for both *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) and *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) samples.

de secado y luego se realizaron 3 mediciones a 100, 150 y 200 min. Se empleó el método gravimétrico para la determinación de humedad. En cada intervalo de tiempo se pesó la muestra y se comparó con la pesada anterior, determinando el punto final de secado cuando no hubo variación de peso. Este procedimiento se aplicó tanto para la muestra de *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) como de *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae).

### Modelación matemática de las curvas de secado

El contenido de humedad calculado por medio de la siguiente ecuación, Doymaz, 2014:

$$MR=M/M_0 \text{ (Ecuación 1)}$$

Dónde: M y  $M_0$  son el contenido de humedad a cualquier tiempo ( $\text{kg de agua.kg de materia seca}^{-1}$ ) y la humedad inicial de las muestras ( $\text{kg de agua.kg de materia seca}^{-1}$ ), respectivamente. Para determinar el contenido de agua en función del tiempo de secado se aplicaron nueve (9) modelos matemáticos no lineales que se muestran en el cuadro 1, estos modelos son utilizados por varios autores para describir el secado en capa fina en frutas, legumbres, hojas de té, cárnicos y hongos.

La mayoría de los modelos empleados son funciones de descomposición exponencial que describen el proceso de disminución de humedad en relación al tiempo. Sólo el modelo de Wang y Singh representa una ecuación polinómica de segundo grado, que ofrece una buena predicción de datos experimentales (Doymaz, 2014).

### Mathematical modeling of drying curves

The moisture content calculated by using the following equation, Doymaz, 2014:

$$MR=M/M_0 \text{ (Equation 1)}$$

Where: M and  $M_0$  are the moisture content at any time ( $\text{kg water.kg dry matter}^{-1}$ ) and the initial moisture of the samples ( $\text{kg water.kg dry matter}^{-1}$ ), respectively. To determine the water content as a function of drying time, nine (9) nonlinear mathematical models were applied, which are shown in table 1. These models are used by several authors to describe the thin layer drying of fruits, legumes, tea leaves, meat and mushrooms.

Most of the models used are exponential decomposition functions that describe the process of moisture decrease in relation to time. Only the Wang and Singh model represents a polynomial equation of second degree, which offers a good prediction of experimental data (Doymaz, 2014).

Model adjustments were evaluated with the coefficient of determination  $R^2$ . The mean square error ( $E_{\text{RMS}}$ ) and Chi-square ( $X^2$ ), which represent the difference between values predicted by a model and values observed during experimentation, were also used. High values of  $R^2$  and lower values of ( $E_{\text{RMS}}$ ) and ( $X^2$ ) are the conditions used for choosing the model that best fits the experimental data.

$$E_{\text{RMS}} = \left[ \left( \frac{1}{N} \right) \sum_{i=1}^N (M_{R,exp,i} - M_{R,pre,i})^2 \right]^{1/2} \text{ (Equation 2)}$$

$$X^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (M_{R,exp,i} - M_{R,pre,i})^2}{N-Z} \text{ (Equation 3)}$$

**Cuadro 1. Modelos matemáticos de secado.**

**Table 1. Mathematical models of drying.**

<i>Modelo</i>	<i>Ecuación</i>	<i>Referencias</i>
<i>Newton</i>	$MR=e^{-kt}$ (Ecuación 4)	Rocha <i>et al</i> , 2012
<i>Page</i>	$MR=e^{-kt^n}$ (Ecuación 5)	Zhang <i>et al</i> , 2016
<i>Henderson y Pabis</i>	$MR=a e^{-kt}$ (Ecuación 6)	Rosa <i>et al</i> , 2015
<i>Henderson y Pabis modificado</i>	$MR=ae^{-kt}+be^{-gt}+ce^{-ht}$ (Ecuación 7)	Costa y Pereira, 2013
<i>Logarítmico</i>	$MR=ae^{-kt}+c$ (Ecuación 8)	Doymaz, 2012
<i>Dos términos exponenciales</i>	$MR=a e^{-k_1t}+(1-a) e^{-k_2t}$ (Ecuación 9)	Virgen-Navarro <i>et al</i> , 2016
<i>Exponencial de dos términos.</i>	$MR=ae^{-kt}+(1-a)e^{-kat}$ (Ecuación 10)	Ocampo, 2016
<i>Wang y Singh</i>	$MR=1+at+bt^2$ (Ecuación 11)	Doymaz, 2014
<i>Difusión aproximada</i>	$MR=ae^{-kt}+(1-a)e^{-k_1bt}$ (Ecuación 12)	Ismail y Kocabay, 2018

Modificado de Ertekin y Yaldiz (2004) y Pin *et al*, (2009).

k es el coeficiente cinético de pérdida de humedad en s<sup>-1</sup>; t es el tiempo en s; a, b, c, d ,g y h son coeficientes de ajuste propios de cada modelo.

Modified of Ertekin and Yaldiz (2004) and Pin *et al*, (2009).

k is the kinetic coefficient of moisture loss in s<sup>-1</sup>; t is the time in s; a, b, c, d, g and h are adjustment coefficients specific to each model.

Los ajustes de los modelos se evaluaron con el coeficiente de determinación R<sup>2</sup>. También se empleó el error cuadrático medio (E<sub>RMS</sub>) y Chi cuadrado (), los cuales representan la diferencia entre valores predichos por un modelo y los valores observados durante la experimentación. Los altos valores de R<sup>2</sup> y los valores más bajos de (E<sub>RMS</sub>) y () son las condiciones que se utilizan para la elección del modelo que mejor se ajusta a los datos experimentales.

Where: MR<sub>exp,i</sub> and MR<sub>pre,i</sub> are experimental and predicted dimensionless moisture ratios, N is the number of observations and Z is the number of constants in the model. The statistical analysis is performed with Statistica software and the fitted curves are plotted with Software Origin Pro 8.

**Diffusive coefficient (D<sub>f</sub>)**

The diffusive coefficient is calculated using the following equation, applied by Roberts *et al*, (2008):

$$E_{RMS} = \left[ \left( \frac{1}{N} \right) \sum_{i=1}^N (M_{R,exp,i} - M_{R,pre,i})^2 \right]^{1/2} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

$$MR = \frac{8}{\pi^2} \exp \left[ \frac{-\pi^2 D_f t}{4l^2} \right] \quad \text{(Equation 13)}$$

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (M_{R,exp,i} - M_{R,pre,i})^2}{N-Z} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Dónde:  $M_{R,exp,i}$  y  $M_{R,pre,i}$  son proporciones de humedad adimensionales experimentales y previstas, N es el número de observaciones y Z es el número de constantes que presenta el modelo. El análisis estadístico se realiza con el Software Statistica y las curvas ajustadas se grafican con el Software Origin Pro 8.

### Coefficiente Difusivo ( $D_f$ )

El coeficiente difusivo es calculado usando la siguiente ecuación, empleada por Roberts *et al.*, (2008):

$$MR = \frac{8}{\pi^2} \exp \left[ \frac{-\pi^2 D_f t}{4l^2} \right] \quad (\text{Equation 13})$$

Dónde: MR es el contenido de humedad a cualquier tiempo (s),  $D_f$  es el coeficiente difusivo ( $m^2s^{-1}$ ), l es la distancia media desde el exterior de la muestra hasta el interior de la muestra (m). Para calcular el  $D_f$  se realiza la linealización de la ecuación 13 aplicando logaritmo neperiano a cada lado de la misma y luego se despeja la variable  $D_f$ .

## Resultados y discusión

### Influencia del aire caliente en la cinética de secado de hojas de *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) y *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae)

En la Figura 1 se grafica la pérdida de humedad con relación al tiempo, el secado sigue un período de velocidad decreciente y esto se ve reflejado en la pérdida de kg agua/kg masa. La pérdida

Where: MR is the moisture content at any time (s),  $D_f$  is the diffusive coefficient ( $m^2s^{-1}$ ), l is the average distance from the outside of the sample to the inside of the sample (m). To calculate  $D_f$ , linearization of equation 13 is performed by applying neperian logarithm to each side of the same equation and then the variable  $D_f$  is cleared.

## Results and discussion

### Influence of hot air on the drying kinetics of leaves of *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) and *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae).

In the figure 1, the loss of moisture is plotted in relation to time, and it follows a period of decreasing speed and this is reflected in the loss of kg water / kg mass. The loss of weight in *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) is slightly higher than that of *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) at a temperature of 40°C.

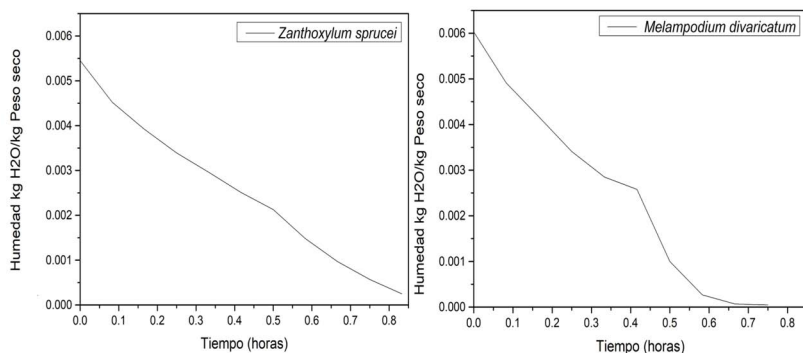
It is observed that in the first 30 min of drying, the water evaporation process is high in both samples, later they decrease as the moisture in the plant matrix is released with greater difficulty. These results are in agreement with those obtained in investigations by Coloma-Paxi *et al.*, (2017), Rocha *et al.*, (2012) and Abano *et al.*, (2011) on drying of plant samples. This means that the physical mechanism governs the movement of moisture in the samples is dominated by the diffusion of water vapor or bound water through the dried tissue to the drying air at a slower rate than

de peso en *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) es ligeramente mayor que la de *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) a la temperatura de 40°C.

Se observa que en los primeros 30 min. de secado el proceso de evaporación del agua es alta en ambas muestras, posteriormente disminuyen a medida que la humedad de la matriz de las plantas es liberada con mayor dificultad. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en investigaciones realizadas por Coloma-Paxi *et al.*, (201760 and 70 °C), Rocha *et al.*, (2012) y Abano *et al.*, (2011) en secado de muestras vegetales. Esto significa que el mecanismo físico que gobierna el movimiento de la humedad en las muestras está dominado por la difusión de vapor de agua o agua ligada a través del tejido seco al aire de secado a una velocidad más lenta que la velocidad de evaporación de la superficie (Doymaz, 2014).

the evaporation rate from the surface (Doymaz, 2014).

In Figure 2, it is observed that the decreasing period speed is predominant in both samples. There is no induction period prior to drying and a slight period of constant speed is visualized in the sample of *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae), when the average critical moisture is in the range of 0.5 to 1. In *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) this period of constant speed is observed when the average critical moisture is in the range of 0.15 to 0.20. In addition, a rebound in drying speed is observed in both samples after the constant speed stage, which is mostly pronounced in *Melampodium divaricatum* (Asteraceae). This phenomenon is very similar to that reported by Abano *et al.*, (2011), in the drying of tomato slices at 50°C; these irregularities are



**Figura 1. Variación de la proporción de la humedad en función del tiempo de secado de *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) y *Melampodium divaricatum* (Asteraceae).**

**Figure 1. Variation of the moisture proportion as a function of drying time of *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) and *Melampodium divaricatum* (Asteraceae).**

En la figura 2, se observa que la velocidad de período decreciente es la que predomina en ambas muestras. No existe ningún período de inducción previo del secado y se visualiza un ligero período de velocidad constante en la muestra de *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae), cuando la humedad crítica promedio se encuentra en el intervalo de 0,5 hasta 1. En *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) dicho período de velocidad constante se observa cuando la humedad crítica promedio se encuentra en el intervalo de 0,15 hasta 0,20. Además, se observa un repunte de la velocidad de secado en ambas muestras luego de la etapa de velocidad constante, la cual es mayormente pronunciada en la *Melampodium divaricatum* (Asteraceae). Este fenómeno es muy parecido al reportado por Abano *et al.*, (2011), en el secado de rodajas de tomate a 50 °C; estas irregularidades se deben a que la temperatura con la que se realiza el secado no es la adecuada.

Finalmente, se visualiza que la velocidad de secado seleccionada en ambas plantas empieza a decrecer, lo que está en concordancia con el período en que la velocidad y temperatura suministrada a las muestras en el secador de túnel no es suficiente para extraer las moléculas de agua en su totalidad. Este fenómeno permite que continúen los procesos de transporte y se pueda disminuir aún más la humedad de las muestras, lo que concuerda con los estudios de cinéticas de secado determinadas por Castro *et al.*, (2009); Sandoval-Torres *et al.*, (2006).

due to the inadequate temperature at which drying is performed.

Finally, it is visualized that the selected drying speed in both plants, starts to decrease, which is in accordance with the period in which the speed and temperature supplied to the samples in the tunnel dryer is not enough to extract molecules of water in their totality. This phenomenon allows the transport processes to continue and the moisture content of the samples can be further reduced, which is in agreement with the drying kinetics studies determined by Castro *et al.* (2009); Sandoval-Torres *et al.* (2006).

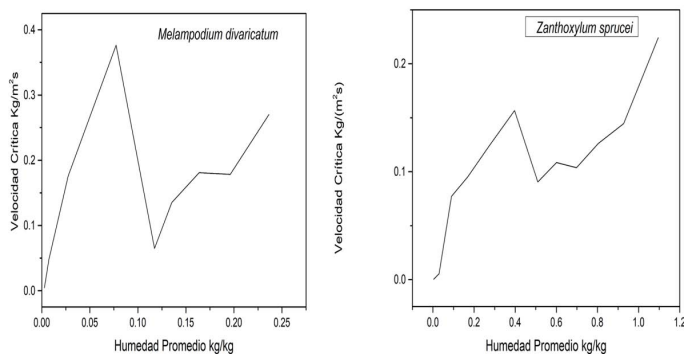
### Mathematical modeling of the drying kinetics

Experimental drying data of *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) and *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) are adjusted to the proposed models and the adjustments coefficients are determined for each one. Figures 3 and 4 show the settings for the the 8 mathematical models proposed at 40°C.

Table 2 shows the statistical parameters used for the adjustment of the drying curves of the samples, most of the models present an adjustment which can describe the drying kinetics of each one, however, the selection of the model that presents the best fit is based on the one that obtained lower values of  $X^2$  and  $E_{RMS}$  and an  $R^2$  of at least 0.97 as described by the methodology of Doymaz, (2014).

Most of the models used in the *Melampodium divaricatum* samples presented an  $R^2$  lower than 0.97, only 2 of the 8 models applied managed to





**Figura 2. Variación de la velocidad crítica en función de la humedad promedio en el secado de las hojas de las especies *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae).**

**Figure 2. Variation of the critical speed as a function of average moisture in the drying of the leaves of *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) and *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) species.**

### Modelación matemática de la cinética de secado

Los datos experimentales de secado de *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) y *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) se ajustan a los modelos propuestos y se determinan los coeficientes de ajuste para cada uno. Las figuras 3 y 4 muestran los ajustes para los 8 modelos matemáticos propuestos a 40°C.

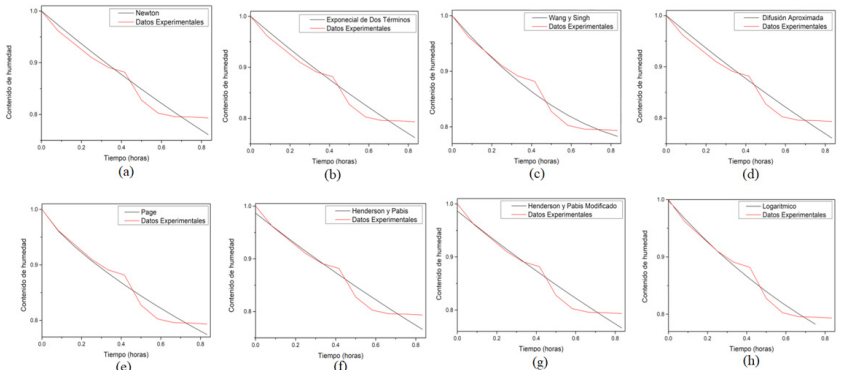
En el cuadro 2 se observan los parámetros estadísticos que se utilizan para el ajuste de las curvas de secado de las muestras, la mayoría de los modelos presentan un ajuste el cual pueda describir la cinética de secado de cada una, sin embargo, la selección del modelo que presenta mejor ajuste se basa en aquel que obtuvo menores valores de  $X^2$  y  $E_{\text{RMS}}$  y un  $R^2$  de como mínimo 0,97 tal como lo describe la metodología de Doymaz, (2014).

fit the experimental data, these being the Logarithmic model and the Wang and Singh model, the latter being the one with the best fit according to the values of  $X^2$  and  $E_{\text{RMS}}$ , coinciding with the values reported by Salcedo, (2016).

In the modeling of *Zanthoxylum sprucei* only the Wang and Singh and Logarithmic models presented a good fit to the experimental drying data, being this time the Logarithmic model the one that had lower values of  $X^2$  and  $E_{\text{RMS}}$ , coinciding these results with those obtained for mushroom drying by Doymaz (2014) and yam drying by Montes *et al*, (2008).

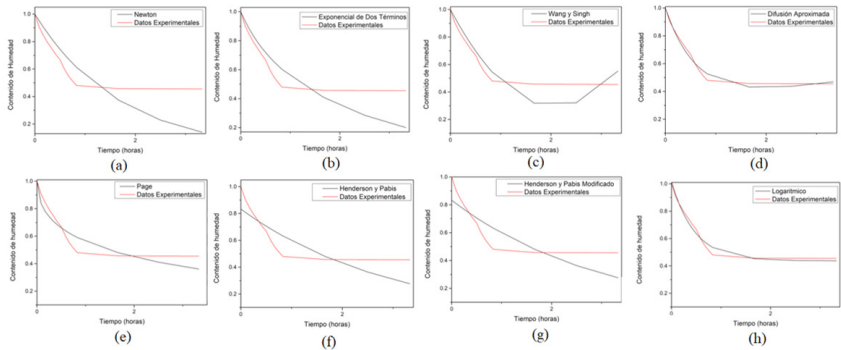
### Diffusive coefficient ( $D_f$ )

The values calculated from the Diffusive coefficient ( $D_f$ ) are found in the table 3. Even though in the literature there are not values reported from  $D_f$  of the studied leaves, these have similar values to those



**Figura 3. Modelado cinético del secado de *Melampodium divaricatum* (Asteraceae), modelo de Newton (a), modelo Exponencial de Dos Términos (b), modelo de Wang y Singh (c), modelo Difusión Aproximada (d), modelo de Page (e), modelo de Henderson y Pabis (f), modelo de Henderson y Pabis Modificado (g), modelo Logarítmico (h)**

**Figure 3. Kinetic modeling of *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) drying, Newton model (a), Two Terms Exponential model (b), Wang and Singh model (c), Approximate Diffusion model (d), Page model (e), Henderson and Pabis model (f), Modified Henderson and Pabis model (g), Logarithmic model (h).**



**Figura 4. Modelado cinético del secado de *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae), modelo de Newton (a), modelo Exponencial de Dos Términos (b), modelo de Wang y Singh (c), modelo Difusión Aproximada (d), modelo de Page (e), modelo de Henderson y Pabis (f), modelo de Henderson y Pabis Modificado (g), modelo Logarítmico (h).**

**Figure 4. Kinetic modeling of *Zanthoxylum sprucei* (Rutaceae) drying, Newton model (a), Two Terms Exponential model (b), Wang and Singh model (c), Approximate Diffusion model (d), Page model (e), Henderson and Pabis model (f), Modified Henderson and Pabis model (g), Logarithmic model (h).**

## Cuadro 2. Modelos matemáticos de secado.

Table 2. Mathematical drying models.

<i>Especie</i>	<i>Modelos</i>	<i>Coefficientes ajustados</i>	$R^2$	$E_{RMS}$	$X^2$
<i>Melampodium divaricatum</i>	Newton	k: 0,327	0,9498	1,100x10 <sup>-2</sup>	1,380x10 <sup>-4</sup>
	Exponencial de dos términos	k:0,507 a: 0,415	0,9530	1,000x10 <sup>-2</sup>	1,310x10 <sup>-4</sup>
	Wang y Signh	a: -0,416 b: 0,186	0,9766	6,000x10 <sup>-4</sup>	5,933x10 <sup>-7</sup>
	Difusión Aproximada	a: 5,018 b: 1,000 k: 0,328	0,9498	1,100x10 <sup>-2</sup>	1,700x10 <sup>-4</sup>
	Page	k: 0,296 n: 0,806	0,9693	9,000x10 <sup>-4</sup>	1,103x10 <sup>-6</sup>
	Henderson y Pabis	a:0,986 k: 0,303	0,9590	8,510x10 <sup>-5</sup>	8,852x10 <sup>-9</sup>
	Henderson y Pabis Modificado	a: 0,328 k: 0,303 b: 0,328 g:0,303 c:0,328 h: 0,303	0,9590	8,510x10 <sup>-5</sup>	1,593x10 <sup>-8</sup>
	Logarítmico	w: 0,330 k:1,330 i: 0,670	0,9739	2,390x10 <sup>-1</sup>	7,860x10 <sup>-2</sup>
<i>Zanthoxylum sprucei</i>	Newton	k: 0,590	0,435	6,900 x10 <sup>-2</sup>	0,005
	Exponencial de dos términos	k: 2,532 a: 0,168	0,646	5,600 x10 <sup>-2</sup>	0,003
	Wang y Signh	a: -0,684 b: 0,165	0,834	8,200 x10 <sup>-2</sup>	0,007
	Difusión Aproximada	a: 0,677 b: -0,067 k:1,646	0,983	4,000 x10 <sup>-3</sup>	2,494x10 <sup>-5</sup>
	Page	k:0,575 n: 0,474	0,880	1,500x10 <sup>-2</sup>	0,0002
	Henderson y Pabis	a: 0,832 k: 0,331	0,662	1,500x10 <sup>-2</sup>	0,0002
	Henderson y Pabis Modificado	a: 0,277 k:0,331 b:0,277 g:0,331 c: 0,277 h: 0,331	0,662	1,500x10 <sup>-2</sup>	0,0004
	Logarítmico	w:0,578 k: 2,132 i: 0,436	0,978	4,727x10 <sup>-12</sup>	2,844x10 <sup>-23</sup>

La mayoría de los modelos empleados en las muestras de *Melampodium divaricatum* presentaron un  $R^2$  inferior a 0,97 tan sólo 2 de los 8 modelos aplicados logran ajustarse a los datos experimentales, siendo estos el modelo Logarítmico y el modelo de Wang y Singh, siendo este último aquel que mejor ajuste presenta de acuerdo a los valores de  $X^2$  y  $E_{RMS}$ , coincidiendo con los valores reportados por Salcedo, (2016).

En la modelación de *Zanthoxylum sprucei* sólo los modelos de Wang y Singh y el Logarítmico presentaron un buen ajuste a los datos experimentales del secado, siendo esta vez el modelo Logarítmico el que tuvo valores más bajos de  $X^2$  y  $E_{RMS}$ , coincidiendo estos resultados con los obtenidos para el secado de hongos por Doymaz (2014) y secado de ñame por Montes *et al.*, (2008).

**Coefficiente difusivo ( $D_f$ )**

Los valores calculados del Coeficiente Difusivo ( $D_f$ ) se encuentran en el cuadro 3. Pese a que en la literatura no existen valores reportados de  $D_f$  de las hojas estudiadas, éstas poseen valores similares a los encontrados por Özbek y Dadali, (2007) en hojas de menta y Akpinar, (2006) en hojas aromáticas los cuales van desde  $10^{-10}$  hasta  $10^{-12}.m^2.s^{-1}$ .

**Cuadro 3. Coeficiente Difusivo ( $D_f$ ).**

**Table 3. Diffusive coefficient ( $D_f$ ).**

Muestra	$D_f$ ( $m^2.s^{-1}$ )
<i>Melampodium divaricatum</i> (Asteraceae)	$5,636 \times 10^{-10}$
<i>Zanthoxylum de sprucei</i> (Rutaceae)	$6,712 \times 10^{-11}$

found by Özbek and Dadali, (2007), on the leaves of mint, and Akpinar (2006) on aromatic leaves which are from  $10^{-10}$  to  $10^{-12} m^2.s^{-1}$ .

**Conclusions**

From the drying curves, the absence of induction periods, a small area of constant weight loss and a large decreasing area in both samples is evidenced. Likewise, it is established that the reduction in sample weights is directly proportional to the drying time of the samples. Diffusion is the mechanism that governs the migration of moisture in the samples of *Melampodium divaricatum* and *Zanthoxylum sprucei*. The logarithmic model is the one with the best adjustment in the samples of *Zanthoxylum sprucei*, while the Wang and Singh model, was the one with the best adjustment for the experimental data of *Melampodium divaricatum*.

*End of English Version*

**Conclusiones**

A partir de las curvas de secado se evidencia la ausencia de períodos de inducción, una pequeña zona de pérdida de peso constante y una gran zona decreciente en ambas muestras.

Asimismo, se establece que la reducción de pesos de las muestras es directamente proporcional al tiempo de secado de las muestras. La difusión es el mecanismo que gobierna la migración de humedad en las muestras de *Melampodium divaricatum* y *Zanthoxylum sprucei*. El modelo logarítmico es aquel que mejor ajuste presenta en las muestras de *Zanthoxylum sprucei*, mientras que el modelo de Wang y Singh, fue el que mejor ajuste presenta para los datos experimentales de *Melampodium divaricatum*.

## Literatura citada

- Abano, E. E., H. Ma, and W. Qu. 2011. Influence of air temperature on the drying kinetics and quality of tomato slices. *J. Food Process Technol.* 2(5), 1-9.
- Adegbite, A. E., F. M. Ojo, O. G. Abraham, J. Francis and S. Balogun. 2019. First record of *Melampodium divaricatum* (Asteraceae) in West Tropical Africa. *Nordic Journal of Botany.* 37(4), 1-16.
- Agra, M. D. F., P. F. D. Freitas and J. M. Barbosa-Filho. 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev. Brasileira de Farmacognosia.* 17(1), 114-140.
- Akpınar, E. K. 2006. Mathematical modelling of thin layer drying process under open sun of some aromatic plants. *J. of Food Engineering.* 77(4), 864-870.
- Ali, A., C. C. Oon, B. L. Chua, A. Figiel, C. H. Chong, A. Wojdylo and J. Lyczko. 2020. Volatile and polyphenol composition, anti-oxidant, anti-diabetic and anti-aging properties, and drying kinetics as affected by convective and hybrid vacuum microwave drying of *Rosmarinus officinalis* L. *Industrial Crops and Products.* 151, 1-13.
- Arslan, D. and M. M. Özcan. 2008. Evaluation of drying methods with respect to drying kinetics, mineral content and colour characteristics of rosemary leaves. *Energy Conversion and Management.* 49(5), 1258-1264.
- Bellagha, S., E. Amami, A. Farhat and N. Kechaou. 2002. Drying kinetics and characteristic drying curve of lightly salted sardine (*Sardinella aurita*). *Drying Technology.* 20(7), 1527-1538.
- Binutu, O. A. and G. A. Cordell. 2000. Constituents of *Zanthoxylum sprucei*. *Pharmaceutical Biology.* 38(3), 210-213.
- Can, A. 2000. Drying kinetics of pumpkinseeds. *Int. J. of Energy Research.* 24(11), 965-975.
- Castro, M. L. P., A. C. Villalobos y G. C. Gamboa. 2009. Efecto de las condiciones de secado sobre la cinética de deshidratación de las hojas de morera (*Morus alba*). *Agronomía Mesoamericana.* 275-283.
- Coloma-Paxi, A., R. Paquita-Ninaraqui, R. Velásquez-Huallpa y R. L. Abarca. 2017. Efecto del escaldado y la temperatura en la cinética de secado de las hojas de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), variedad Salcedo INIA. *Agro Sur.* 45(3), 57-73.
- Costa, A. and H. Pereira. 2013. Drying kinetics of cork planks in a cork pile in the field. *Food and Bioproducts Processing.* 91, 14-22.
- Doymaz, I. 2012. Evaluation of some thin-layer drying models of persimmon slices (*Diospyros kaki* L.). *Energy Conversion and Management.* 56, 199-205.
- Doymaz, I. 2014. Drying kinetics and rehydration characteristics of convective hot-air dried white button mushroom slices. *J. of Chem.* 1-8.
- Erbay, Z. and F. Icier. 2010. A review of thin layer drying of foods: theory, modeling, and experimental results. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 50(5), 441-464.
- Ertekin, C. and O. Yaldiz. 2004. Drying of eggplant and selection of a suitable thin layer drying model. *J. of Food Engineering.* 63(3), 349-359.

- Fernandez, L., M. Ascanio, I. Botero, L. Cadenas, A. Matos y C. Sumoza. 2012. Etnobotánica: Una aproximación al conocimiento tradicional de las plantas medicinales. Memorias del Instituto de Biología Experimental. 6, 209-212.
- García, S. V., M. E. Schmalko y A. Tanzariello. 2007. Isothermas de adsorción y cinética de secado de ciertas hortalizas y aromáticas cultivadas en misiones. *RIA. Rev. de Investigaciones Agropecuarias*. 36(1), 115-129.
- Graham, J., S. Pendland, J. Prause, L. Danzinger, J. S. Vigo, F. Cabieses and N. Farnsworth. 2003. Antimycobacterial evaluation of Peruvian plants. *Phytomedicine*. 10(6-7), 528-535.
- Helen, C., V. Antonio, M. Y. Z. Bourgeois y D. Westhoff. 2003. Tecnología de alimentos. Editorial LIMUSA. Mexico. 768 p.
- Holowaty, S. A., A. E. Thea, C. Alegre and M. E. Schmalko. 2018. Differences in physicochemical properties of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) obtained using traditional and alternative manufacturing methods. *J. of Food Process Engineering*. 41(8), 17-23.
- Ismail, O. and O. G. Kocabay. 2018. Drying kinetics of hot-air dried beef meat: application of mathematical models, energy consumption, and color characteristics. *Heat Transfer Research*. 49(14).
- Kaya, A. and O. Aydın. 2009. An experimental study on drying kinetics of some herbal leaves. *Energy Conversion and Management*. 50(1), 118-124.
- Kumar, C., A. Karim, S. C. Saha, M. U. H. Joardder, R. Brown and D. Biswas. 2012. Multiphysics Modelling of convective drying of food materials. Proceedings of the Global Engineering, Science and Technology Conference. 2012.
- Lorenzi, H. 2008. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4ta Edición. Instituto Plantarum de Estudos da Flora. Print Book. Nova Odessa SP (Brazil). 608 p.
- Montes, E. J. M., R. T. Gallo, R. D. A. Pizarro, O. A. P. Sierra y J. L. M. Escobar. 2008. Modelado de la cinética de secado de ñame (*Dioscorea rotundata*) en capa delgada. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 28, 9.
- Moreira, R. R. D., A. G. Santos, F. A. Carvalho, C. H. Perego, E. J. Crevelin, A. E. M. Crotti and C. V. Nakamura. 2019. Antileishmanial activity of *Melampodium divaricatum* and *Casearia sylvestris* essential oils on *Leishmania amazonensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 61, 1-7.
- Neto, J. R. F. y A. C. P. Chagas. 2001. A homocisteína como fator de risco coronariano. *Atherosclerosis*. 12(1), 20-25.
- Ocampo, A. 2016. Modelo cinético del secado de la pulpa de mango. *Revista EIA*. 3(5), 119-128.
- Origin Lab(Pro). 2021. Versión 8.0. OriginLab Corporation. Northampton, MA, EE. UU.
- Özbek, B. and G. Dadali. 2007. Thin-layer drying characteristics and modelling of mint leaves undergoing microwave treatment. *J. of Food Engineering*. 83(4), 541-549.
- Pelissari, G. P., R. C. L. R. Pietro y R. R. D. Moreira. 2010. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC., Asteraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 20(1), 70-74.
- Pin, K. Y., T. Chuah, A. A. Rashih, C. Law, M. Rasadah and T. Choong. 2009. Drying of betel leaves (*Piper betle* L.): Quality and drying kinetics. *Drying Technology*. 27(1), 149-155.
- Rattanamechaiskul, C. and N. Junka. 2020. Modeling of fragment formation of parchment coffee beans for rapid heat and mass transfer during fluidization drying. *J. of Food Processing and Preservation*. 44(8), 1-9.
- Roberts, J. S., D. R. Kidd and O. Padilla-Zakour. 2008. Drying kinetics of grape seeds. *Journal of Food Engineering*. 89(4), 460-465.





- Rocha, R. P., E. da Melo, J. B. de C. Corbín, P. A. Berbert, S. M. L. Donzeles y J. A. Tabar. 2012. Cinética del secado de tomillo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 16(6), 675-683.
- Rondón M., S. Moncayo, X. Cornejo, J. Santos, D. Villalta, R. Siguencia and J. Duche. 2018. Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas Province Ecuador. *Journal of King Saud University – Science*. 30(4), 500-505.
- Rosa, D. P., D. Cantú-Lozano, G. Luna-Solano, T. C. Polachini and J. Telis-Romero. 2015. Mathematical modeling of orange seed drying kinetics. *Ciência e Agrotecnologia*. 39(3), 291-300.
- Salcedo, J. 2016. Modelado de la cinética de secado del afrecho de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 15(3), 883-891.
- Salibová, D. 2021. Ayahuasca ethno-tourism and its impact on the Indigenous Shuar Community (Ecuador) and Western Participants. *Cesky Lid*. 107(4), 511-532.
- Sandoval-Torres, S., J. Rodríguez-Ramírez, L. Méndez-Lagunas y J. Sánchez-Ramírez. 2006. Rapidez de secado reducida: Una aplicación al secado convectivo de plátano Roatán. *dokumen.tips*. 5(1), 35-38.
- SAS Institute, Inc. 2004. *SAS user's guide: Statistics*. 9th edition. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Sponchiado, G., M. L. Adam, C. D. Silva, B. S. Soley, C. de Mello-Sampayo, D. A. Cabrini and M. F. Otuki. 2016. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *J. of ethnopharmacology*. 178, 289-296.
- Tiwary, M., S. Naik, D. K. Tewary, P. Mittal and S. Yadav. 2007. Chemical composition and larvicidal activities of the essential oil of *Zanthoxylum armatum* DC (Rutaceae) against three mosquito vectors. *Journal of vector borne diseases*. 44(3), 198.
- Virgen-Navarro, L., E. J. Herrera-Lopez y H. Espinosa-Andrews. 2016. Estimación del coeficiente de difusividad durante el tostado de café en un lecho fuente utilizando un modelo difuso. 15(2), 13.
- Zhang, Q.-A., Y. Song, X. Wang, W. Q. Zhao and X. H. Fan. 2016. Mathematical modeling of debittered apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernels during thin-layer drying. *J. of Food*. 14(4), 509-517.

## Willingness to pay and consumer preferences for organic lettuce (*Lactuca sativa* L.)

Disposición a pagar y preferencias por lechugas orgánicas (*Lactuca sativa* L.)

Disposição a pagar e preferências por alface orgânica (*Lactuca sativa* L.)

Arcadio A. Cerda<sup>1</sup>, Leidy Y. García<sup>1\*</sup>, Angela I. Viscay<sup>2</sup> and Beatriz M. López<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Economics & Business, University of Talca, 1 Poniente 1141, Talca, Chile, Email: (AC) [acerda@utalca.cl](mailto:acerda@utalca.cl), ; (LG) [lgarcia@utalca.cl](mailto:lgarcia@utalca.cl),  <sup>2</sup>Graduate of Commercial Engineer, University of Talca, Talca, Chile, Email: (AV) [angela.viscay@gmail.com](mailto:angela.viscay@gmail.com), ; (BL) [beatriz.m.lg17@gmail.com](mailto:beatriz.m.lg17@gmail.com), 

### Abstract

Global production of organic products has grown significantly due to increased environmental awareness and healthier lifestyles. However, vegetable growers often lack relevant information about people's preferences and willingness to pay (WTP) for such products. This difficulty is even more pronounced in developing countries, as Chile, mainly due to the low demand increase for organic products. This research aims to analyze preferences and WTP for Chilean organic lettuce. To obtain the WTP, the contingent valuation (CV) method and conjoint analysis (CA) was applied. The data were obtained from a cross-sectional survey using a representative sample of 416 subjects from the Maule region, Chile, stratified by income level. The results showed that subjects were willing to pay a premium of 26.72% and 52.83% for an organic head of lettuce compared to conventionally grown products, according to CA and CV methods, respectively. These results show a strong preference for organic products. Furthermore, the CA method indicated that the organic variety of *Lactuca sativa* L. var. *crispa* L., at its lowest observed price, was the consumer's product of choice. Finally, the main reasons to consume this type of product are, firstly, its higher quality, followed by its taste or smell, and finally, it has better nutritional contents. Therefore, lettuce growers

---

Received el 27-08-2020 • Accepted el 23-02-2021.

\*Corresponding author: Email: [lgarcia@utalca.cl](mailto:lgarcia@utalca.cl).



can use the estimated premium price as a reference when making decisions about production and pricing.

**Keywords:** organic production; conjoint analysis; contingent valuation; lettuce; Chile.

### Resumen

La producción mundial de productos orgánicos ha crecido significativamente debido a una mayor conciencia ambiental y a estilos de vida más saludables. Sin embargo, los productores de verduras a menudo carecen de información relevante acerca de las preferencias y disposición de las personas a pagar (WTP) por dichos productos. Esta dificultad, es aún más pronunciada en los países en desarrollo, como Chile, debido principalmente al bajo crecimiento de la demanda de productos orgánicos. Esta investigación tiene como objetivo analizar las preferencias y el WTP para la lechuga orgánica chilena. El método para obtener el WTP fue aplicar la valoración contingente (CV) y el análisis conjunto (CA). Los datos se obtuvieron de una encuesta transversal utilizando una muestra representativa de 416 sujetos dentro de la región del Maule de Chile, estratificados por nivel de ingresos. Los resultados muestran una disposición a pagar por un sobreprecio de 26,72% y 52,83 % por cabeza de lechuga orgánica en comparación con los productos cultivados convencionalmente, de acuerdo con los métodos CA y CV, respectivamente, evidenciándose una fuerte preferencia por los productos orgánicos. Además, el método CA indicó que la variedad *Lactuca sativa* L. var. crispa L., del precio más bajo observado, fue el producto elegido por los consumidores. Finalmente, las principales razones para consumir este tipo de productos son, su mayor calidad, su sabor u olor, y finalmente, sus mejores contenidos nutricionales. Los productores de lechuga pueden utilizar el precio de la prima estimada como referencia al tomar decisiones sobre producción y precios.

**Palabras clave:** producción orgánica, análisis conjunto, valoración contingente, lechuga, Chile.

### Resumo

A produção global de produtos orgânicos cresceu significativamente devido a uma maior consciência ambiental e estilos de vida mais saudáveis. No entanto, os produtores de vegetais geralmente carecem de informações relevantes sobre as preferências das pessoas e a disposição de pagar (WTP) por tais produtos. Essa dificuldade é ainda mais pronunciada em países em desenvolvimento, como o Chile, principalmente devido ao baixo crescimento da demanda por produtos orgânicos. Esta pesquisa tem como objetivo analisar as preferências e a WTP pela alface orgânica chilena. O método de obtenção da WTP consistia em aplicar a avaliação contingente (CV) e a análise conjunta (CA). Os dados foram obtidos a partir de uma pesquisa transversal usando uma amostra representativa de 416 indivíduos na região de Maule, no Chile, estratificada por nível de renda.

Os resultados mostram uma disposição a pagar um prêmio de 26,72% e 52,83% por cabeça de alface orgânica em relação aos produtos de cultivo convencional, segundo os métodos CA e CV, respectivamente, apresentando forte preferência pelos produtos orgânicos. Além disso, o método CA indicou que a variedade *Lactuca sativa* L. var. *crispa* L., com o menor preço observado, foi o produto de escolha dos consumidores. Por fim, os principais motivos para consumir este tipo de produto são a sua qualidade superior, o seu sabor ou cheiro e, por último, o seu melhor conteúdo nutricional. Os produtores de alface podem usar o preço premium estimado como referência ao tomar decisões de produção e preço.

**Palavras-chave:** produção orgânica; análise conjunta; avaliação contingente; alface Chile.

## Introduction

The demand for organic products has experienced considerable growth since the second half of the 1990s, and this trend is forecast to continue in the coming years. The growth of this market can be attributed to increased consumer health problems, greater awareness of the benefits of eating organically grown food and higher income levels (Ahmed *et al.*, 2020; Britwum and Yiannaka, 2019; Wang *et al.*, 2017).

The available data on the supply of organic food products indicate an upward trend over time both in certified organic food production and in the number of producers. Some studies show that organic agricultural land worldwide, including lands being converted for that use, amounted to around seventy-one million hectares in 2018, whereas North America and Latin America only had shares of 5 % and 11 %, respectively, with a continuous increase in the last twenty years (Willer *et al.*, 2020). However, during 2017–2018, countries like the United States and Chile reduced

## Introducción

La demanda de productos orgánicos ha experimentado un crecimiento considerable desde la segunda mitad de la década de 1990 y se prevé que esta tendencia continúe en los próximos años. El crecimiento de este mercado se puede atribuir a un aumento de los problemas de salud de los consumidores, una mayor conciencia de los beneficios de comer alimentos cultivados orgánicamente y mayores niveles de ingresos (Ahmed *et al.*, 2020; Britwum y Yiannaka, 2019; Wang *et al.*, 2017).

Los datos disponibles sobre la oferta de productos alimenticios orgánicos indican una tendencia ascendente en el tiempo tanto en la producción de alimentos orgánicos certificados como en el número de productores. Algunos estudios muestran que las tierras agrícolas orgánicas en todo el mundo, incluidas las tierras que se están convirtiendo para ese uso, ascendieron a alrededor de setenta y un millones de hectáreas en 2018, mientras que América del Norte y América Latina solo tenían

their total organic hectares by 0,4 % and 16,0 %, respectively (Willer *et al.*, 2020). Nevertheless, studies have shown that some companies have been reluctant to supply organic products due to higher associated production costs and the accreditation required to carry out such operations (Wang, Zhu and Chu, 2017). Still, given the increased demand for organic products, it is clear that citizens' environmental awareness is increasing, but it is not yet high enough to warrant sustained production of organic products and services in developing countries.

In Chile, the barriers to organic food consumption are related to the lack of information and availability (Kushwah *et al.*, 2019). Part of the above factors has been spurred by consumers' per capita income levels, as the demand for organic products, as with normal goods, is expected to increase along with higher incomes (Ranjbarshamsi *et al.*, 2016).

There is only limited information about consumer preferences and their willingness to pay (WTP) for organic products in developing countries, despite extensive research in more developed countries (Bhattacharai, 2019; Li *et al.*, 2019; Pham *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2017). The literature that measures WTP and certain attributes that are particularly related to avoiding contamination of fruits and vegetables are extensive, but it does not necessarily focus on organic agricultural products, much less on organic lettuce (Nishi, 2017).

Studies analyzing the characteristics and WTP of Chilean organic products have been performed

participaciones del 5 % y el 11 %, respectivamente, con un aumento continuo en los últimos veinte años (Willer *et al.*, 2020). Sin embargo, durante 2017-2018, países como Estados Unidos y Chile redujeron sus hectáreas orgánicas totales en 0,4 % y 16,0 %, respectivamente (Willer *et al.*, 2020). Sin embargo, los estudios han demostrado que algunas empresas se han mostrado reacias a suministrar productos orgánicos debido a los mayores costos de producción asociados y la acreditación requerida para llevar a cabo dichas operaciones (Wang, Zhu y Chu, 2017). Aún así, dada la creciente demanda de productos orgánicos, está claro que la conciencia ambiental de los ciudadanos está aumentando, pero aún no es lo suficientemente alta como para justificar la producción sostenida de productos y servicios orgánicos en los países en desarrollo.

En Chile, las barreras al consumo de alimentos orgánicos están relacionadas con la falta de información y disponibilidad (Kushwah *et al.*, 2019). Parte de los factores anteriores ha sido estimulado por los niveles de ingreso per cápita de los consumidores, ya que se espera que la demanda de productos orgánicos, al igual que con los bienes normales, aumente junto con mayores ingresos (Ranjbarshamsi *et al.*, 2016).

Existe información limitada sobre las preferencias de los consumidores y su disposición a pagar (WTP) por productos orgánicos en países en desarrollo, a pesar de una extensa investigación en países más desarrollados (Bhattacharai, 2019; Li *et*

for grapes (Cerdea *et al.*, 2011), apples (Cerdea *et al.*, 2012), pears (Cerdea *et al.*, 2015). Methods used to estimate WTP include contingent valuation (CV) based on consumer demand theory and discrete choice experiments based on random utility theory or a conjoint analysis (CA) method based on consumer measurement theory (Ghimire *et al.*, 2016).

The literature shows disparate results on preferences and WTP for organic products. For example, in several studies, sociodemographic data did not reflect a significant influence on WTP, or its effect varied considerably depending on the type of product considered. The same was observed with the WTP a premium for an organic product, as many studies have shown a large positive WTP; however, it also varied widely across product categories. In general, studies have shown that people are willing to pay 10 % to 40 % premiums for organic food. Furthermore, consumers displayed higher WTP within a hypothetical context using CV measurement than they were in a real context. (Bhattarai, 2019; Cerdea *et al.*, 2014; Pham *et al.*, 2019).

Knowing consumer preferences and their WTP is quite relevant because these data allow local producers to improve their decision-making processes regarding production, distribution, and pricing strategies. This in turn enables them to successfully participate in the organic produce market, both to attract more consumers daily and to work with a greater number of suppliers (Schleenbecker and Hamm,

*et al.*, 2019; Pham *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2017). La literatura que mide la WTP y ciertos atributos que están particularmente relacionados con evitar la contaminación de frutas y verduras es extensa, pero no necesariamente se enfoca en productos agrícolas orgánicos y mucho menos en lechugas orgánicas (Nishi, 2017).

Se han realizado estudios que analizan las características y WTP de los productos orgánicos chilenos para uvas (Cerdea *et al.*, 2011), manzanas (Cerdea *et al.*, 2012), peras (Cerdea *et al.*, 2015). Los métodos utilizados para estimar la WTP incluyen la valoración contingente (CV) basada en la teoría de la demanda del consumidor y experimentos de elección discreta basados en la teoría de la utilidad aleatoria o un método de análisis conjunto (CA) basado en la teoría de medición del consumidor (Ghimire *et al.*, 2016).

La literatura muestra resultados dispares sobre las preferencias y la WTP de los productos orgánicos. Por ejemplo, en varios estudios, los datos sociodemográficos no reflejaron una influencia significativa en la WTP, o su efecto varió considerablemente según el tipo de producto considerado. Lo mismo se observó con la WTP una prima para un producto orgánico, ya que muchos estudios han demostrado una gran WTP positiva; sin embargo, también varió ampliamente entre las categorías de productos. En general, los estudios han demostrado que las personas están dispuestas a pagar entre el 10 % y el 40 % de primas por alimentos orgánicos. Además, los consumidores mostraron una DAP

2013). Moreover, WTP estimates provide useful information on how consumers value organic and other important characteristics in products.

This study focuses on the consumption of lettuce because it is considered a product of frequent use, and there is a high demand for them (FAO, 2020; Shatilov *et al.*, 2019). In addition, given the changes in consumer tastes (Rahman *et al.*, 2021), there is a significant potential market for organic lettuces, which would provide new production opportunities for vegetable farmers (Jouzi *et al.*, 2017). The objective of this research is to analyze consumers' preferences and WTP for Chilean organic lettuce. The attribute of greatest importance to consumers of organic lettuce is identified and compared with the WTP for such products. The methods used were CA and CV. In the case of CA, it were used ranking and rating approaches.

## Materials and methods

The research was analytical with an ex-post-fact and transactional design, since the information was taken without manipulation of variables and in a single moment on time. The data were quantitative, and the unit of analysis corresponds to individuals from the Maule Region, Chile. Within this population, the groups of interest were women and men over 18 years of age that belonged to the medium-low income (C3), medium-high income (C2), and high income (ABC1) groups. The sample selection method was non-probabilistic and the sample

más alta en un contexto hipotético utilizando la medición de CV que en un contexto real. (Bhattarai, 2019; Cerdeza *et al.*, 2014; Pham *et al.*, 2019).

El conocimiento de las preferencias de los consumidores y su WTP es bastante relevante porque estos datos permiten a los productores locales mejorar sus procesos de toma de decisiones con respecto a las estrategias de producción, distribución y precios. Esto, a su vez, les permite participar con éxito en el mercado de productos orgánicos, tanto para atraer a más consumidores a diario como para trabajar con un mayor número de proveedores (Schleenbecker y Hamm, 2013). Además, las estimaciones de la WTP proporcionan información útil sobre cómo los consumidores valoran las características orgánicas y otras características importantes de los productos.

Este estudio se centra en el consumo de lechuga porque se considera un producto de uso frecuente y existe una alta demanda de las mismas (FAO, 2020; Shatilov *et al.*, 2019). Además, dados los cambios en los gustos de los consumidores (Rahman *et al.*, 2021), existe un mercado potencial significativo para las lechugas orgánicas, lo que brindaría nuevas oportunidades de producción para los productores de hortalizas (Jouzi *et al.*, 2017). El objetivo de esta investigación es analizar las preferencias de los consumidores y la DAP de la lechuga orgánica chilena. Se identifica el atributo de mayor importancia para los consumidores de lechuga orgánica y se compara con la WTP de dichos productos. Los métodos utilizados

size (416 subjects) was determined by convenience, considering the ease of administration, low costs, and the availability of demographic data.

### Survey description

The survey was carried out during September and October 2018, in the most representative cities of the Maule region, Chile, such as Talca, Linares, and Curicó, with a total population of over 400,000. The final survey was conducted in the form of personal interviews in people's homes. The Cronbach's alpha coefficient for the survey was 0.812, which indicated that it was reliable.

The survey consisted of applying a questionnaire structured in four sections, which included closed ended, ranking, ordering, and Likert questions. The first section on attributes and preferences included a Likert scale of one to five, with statements related to the organic and conventional production methods of lettuce, the importance of price, production method, and preferences regarding variety and types.

The second section on contingent valuation included a hypothetical market which is proposed to the respondents, where the organic product offered, and its availability are described. Respondents are asked directly if they would be willing to pay for a unit of organic lettuce and a random price (bid) is offered among the 10 possible estimated values.

According to people's responses, a second question is asked for a price higher than the one proposed or a lower one, to apply the double-bounded dichotomous method. In the

fueron CA y CV. En el caso de CA, se utilizaron enfoques de ordenamiento (ranking) y calificación (rating).

### Materiales y métodos

La investigación fue analítica con un diseño ex-post-facto y transeccional, ya que la información fue tomada sin manipulación de variables y en un solo momento en el tiempo. Los datos fueron cuantitativos y la unidad de análisis corresponde a individuos de la Región del Maule, Chile. Dentro de esta población, los grupos de interés fueron mujeres y hombres mayores de 18 años pertenecientes a los grupos de ingreso medio-bajo (C3), ingreso medio-alto (C2) y ingreso alto (ABC1). El método de selección de la muestra fue no probabilístico y el tamaño de la muestra (416 sujetos) se determinó por conveniencia, considerando la facilidad de administración, los bajos costos y la disponibilidad de datos demográficos.

### Descripción de la encuesta

La encuesta fue llevada a cabo durante los meses de septiembre y octubre de 2018, en las ciudades más representativas de la región del Maule, Chile, como Talca, Linares y Curicó, con una población total de más de 400.000. La encuesta final se realizó en forma de entrevistas personales en los hogares de las personas. El coeficiente alfa de Cronbach para la encuesta fue 0,812, lo que indicó que era confiable.

La encuesta consistió en la aplicación de un cuestionario estructurado en cuatro secciones, que incluía preguntas cerradas, de

third section on conjoint analysis, 8 profiles of lettuce are presented, which are made up of combinations between prices, varieties, and production methods. The individuals were listed from 1 to 8. Additionally, people were asked to rate these profiles from grades 1 to 7. Finally, a fourth section on sociodemographic aspects was included.

### Conjoint analysis (CA)

CA uses a decomposition method, in which respondents react to a set of attributes while considering the full product. Each attribute is postulated to be of some importance and provides a stimulus in itself, which helps explain an object's attractiveness or overall level of preference based on these characteristics. These preferences are considered consistent with Lancaster's utility maximization theory (Lusk and Hudson, 2004) and can be represented by a global additive utility function, specifically, in our case, with three different prices in Chilean pesos (\$526, \$817 and \$920 CLP), two lettuce varieties (*Lactuca sativa* L. var. *crispa* L. and *Lactuca sativa* L. var. *longifolia* (Lam.)), and two production systems (organic and non-organic).

The lettuce varieties and price levels were obtained from a preliminary survey which considered one hundred people. The model can be expressed as:

$$R_k(D) = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_{1i} D_{1i} + \sum_{j=1}^2 \beta_{2j} D_{2j} + \sum_{l=1}^3 \beta_{3l} D_{3l}$$

Where  $R_k$  represents the dependent variable measured by each of the options that were presented to the study subjects.  $B$  represents the utility

clasificación, de ordenación y de tipo Likert. La primera sección sobre atributos y preferencias incluyó una escala Likert de uno a cinco, con declaraciones relacionadas con los métodos de producción orgánicos y convencionales de la lechuga, la importancia del precio, el método de producción y las preferencias en cuanto a variedad y tipos.

La segunda sección sobre valoración contingente incluyó un mercado hipotético que se propone a los encuestados, donde se describe el producto orgánico ofrecido y su disponibilidad. Se pregunta directamente a los encuestados si estarían dispuestos a pagar por una unidad de lechuga orgánica y se ofrece un precio aleatorio (oferta) entre los 10 posibles valores estimados.

Según las respuestas de las personas, se hace una segunda pregunta por un precio superior al propuesto o inferior, para aplicar el método dicotómico de doble acotación. En la tercera sección de análisis conjunto, se presentan 8 perfiles de lechuga, los cuales se componen de combinaciones entre precios, variedades y métodos de producción. Los individuos se enumeraron del 1 al 8. Además, se le solicitó a las personas que calificaran estos perfiles del 1 al 7. Finalmente, se incluyó una cuarta sección sobre aspectos sociodemográficos.

### Análisis conjunto (CA)

CA utiliza un método de descomposición, en el que los encuestados reaccionan a un conjunto de atributos mientras consideran el producto completo. Se postula que

of each attribute, where,  $i, j, k$  are the attributes, which vary according to their different levels, while  $B_{1i}$ ,  $B_{2j}$ ,  $B_{3l}$  are the coefficients associated with each attribute and measure their partial utility (Ferreira *et al.*, 2009).

Conjoint analysis uses ranking and rating methods. The rating question asks to compare different items using a common scale whereas a ranking question asks to compare different items directly to each other (Ghimire *et al.*, 2016). The value of the marginal WTP for the organic attribute was obtained from:

$$WTP = \frac{\text{coefficient parcial utility organic product}}{\text{price's } \beta \text{ WTP}}$$

Eight product profiles were obtained through an orthogonal design, generated with the IBM SPSS Statistics 23 program, thus limiting the number of possible combinations and generating greater efficiency in respondents' responses (Table 1).

### Contingent valuation (CV)

CV is a hypothetical method that simulates a market throughout a survey, allowing a researcher to obtain the economic value of goods or services that are not necessarily present in the real market. There are different means to determine the willingness to pay (WTP), in this study we used the double-bounded dichotomous choice model. To obtain the payment vector used in the CV method, a preliminary survey of a hundred consumers was conducted to determine the WTP for organic lettuce using an iterative technique to find the minimum mean squared error of the bid design.

The CV model is based on the difference of an indirect utility

cada atributo tiene cierta importancia y proporciona un estímulo en sí mismo, que ayuda a explicar el atractivo de un objeto o el nivel general de preferencia basado en estas características. Estas preferencias se consideran consistentes con la teoría de maximización de la utilidad de Lancaster (Lusk y Hudson, 2004) y puede estar representado por una función de utilidad aditiva global, específicamente, en nuestro caso, con tres precios diferentes en pesos chilenos (\$ 526, \$ 817 y \$ 920 CLP), dos variedades de lechuga (*Lactuca sativa* L.var. *crispa* L. y *Lactuca sativa* L. var. *longifolia* (Lam.), y dos sistemas de producción (orgánico y no orgánico).

Las variedades de lechuga y los niveles de precios se obtuvieron de una encuesta preliminar que consideró a cien personas. El modelo se puede expresar como:

$$R_k(D) = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_{1i} D_{1i} + \sum_{j=1}^2 \beta_{2j} D_{2j} + \sum_{l=1}^3 \beta_{3l} D_{3l}$$

Donde  $R_k$  representa la variable dependiente, medida por cada una de las opciones que se presentaron a los sujetos de estudio.  $B$  representa la utilidad de cada atributo, donde  $i, j, k$  son los atributos, que varían según sus diferentes niveles, mientras  $B_{1i}$ ,  $B_{2j}$ ,  $B_{3l}$  que son los coeficientes asociados a cada atributo y miden su utilidad parcial. (Ferreira *et al.*, 2009).

El análisis conjunto utiliza métodos de ordenamiento y calificación. La pregunta de valoración pide comparar diferentes elementos utilizando una escala común, mientras que una pregunta de ordenamiento solicita



function, i.e., a random variable with some probability distribution used for the parameters. The linear expression for the difference in the indirect utility function model is  $\Delta v_i = \alpha + \beta A_i + \eta$ , where  $A_i$  is the payment vector to which individuals respond if they are willing

comparar diferentes elementos directamente entre sí (Ghimire *et al.*, 2016). El valor de la WTP marginal para el atributo orgánico se obtuvo de:

$$WTP = \frac{\text{coeficiente de utilidad parcial producto orgánico}}{\text{precio } \beta \text{ WTP}}$$

**Tabla 1. Orthogonal design for lettuce profiles.**

**Cuadro 1. Diseño ortogonal para perfiles de lechuga.**

Profile	System of Production	Lettuce Variety	Lettuce Price (\$)¹
1	Conventional	<i>Lactuca sativa</i> L. var. longifolia (Lam.)	920
2	Conventional	<i>Lactuca sativa</i> L. var. crispa L.	817
3	Organic	<i>Lactuca sativa</i> L. var. longifolia (Lam.)	817
4	Organic	<i>Lactuca sativa</i> L. var. longifolia (Lam.)	920
5	Organic	<i>Lactuca sativa</i> L. var. crispa L.	920
6	Conventional	<i>Lactuca sativa</i> L. var. crispa L.	920
7	Organic	<i>Lactuca sativa</i> L. var. crispa L.	526
8	Conventional	<i>Lactuca sativa</i> L. var. longifolia (Lam.)	526

¹ CLP = Chilean pesos.

¹CLP = Pesos chilenos.

to pay for ahead of organic lettuce and is the error estimate that is  $\eta$  assumed to have a logistic distribution.

To measure the maximum WTP for the product, a hypothetical market was created, where the value that an individual assigns to the extracted lettuce is related to its organic nature. The average WTP for an indirect utility function corresponds to:

$$E(WTP) = -\alpha/\beta$$

To apply the above, the first step was to obtain payment vectors in which the product and its benefits were described, then the product quantity, payment method, and product provision, among other aspects, were considered, all of

Se obtuvieron ocho perfiles de producto mediante un diseño ortogonal, generado con el programa IBM SPSS Statistics 23, limitando así el número de combinaciones posibles y generando mayor eficiencia en las respuestas de los encuestados (Cuadro 1).

**Evaluación contingente (CV)**

La CV es un método hipotético que simula un mercado por medio de una encuesta, permitiendo al investigador obtener el valor económico de bienes o servicios que no necesariamente están presentes en el mercado real. Existen diferentes medios para determinar la disposición a pagar (WTP), en este estudio utilizamos el modelo de elección dicotómica de doble

which attempt to simulate a real market (Table 2).

límite. Para obtener el vector de pago utilizado en el método CV, se realizó

**Table 2. Optimal bid vector of WTP for organic lettuce, sample size and bid frequency.**

**Cuadro 2. Vector de oferta óptimo de WTP para lechuga orgánica, tamaño de muestra y frecuencia de oferta.**

Initial bid <sup>1</sup>	Upper bid <sup>1</sup>	Lower bid <sup>1</sup>	Sample distribution	Response for each bid (%)			
			n=416	Yes-Yes	Yes-No	No-Yes	No-No
422	497	211	30	83	13	3	0
572	625	497	50	82	10	2	6
678	723	625	42	57	31	2	10
767	808	723	45	60	18	0	22
849	889	808	43	74	5	21	0
929	970	889	45	51	11	4	33
1011	1056	970	43	51	5	23	21
1100	1153	1056	49	39	8	4	49
1206	1281	1153	46	43	2	0	54
1356	1500	1281	23	13	13	0	74

<sup>1</sup>CLP = Chilean peso. Exchange rate: 1 USD = 653 CLP, June 30, 2018.

<sup>1</sup>CLP = Pesos chilenos. Tasa de cambio: 1 USD = 653 CLP, Junio 30, 2018.

## Results and discussion

### Sample descriptive analysis

Regarding the descriptive analysis of the sample, 416 surveys were classified by socioeconomic level. Sociodemographic definitions are listed in Table 3. Of the total number of respondents, 58.9 % were women, and of these, 65.9 % were between 26-60 years old, belonged to the medium-low and medium-high income strata, and 88 % of them had high school or undergraduate education (Table 3).

Additionally, 98.6% of the respondents had a good or very good knowledge of organic products in general and there was a favorable behavior

una encuesta preliminar a un centenar de consumidores para determinar la WTP de lechuga orgánica mediante una técnica iterativa para encontrar el error cuadrático medio mínimo del diseño de oferta.

El modelo de CV se basa en la diferencia de una función de utilidad indirecta, es decir, una variable aleatoria con alguna distribución de probabilidad utilizada para los parámetros. La expresión lineal para la diferencia en el modelo de función de utilidad indirecta es  $\Delta vi = \alpha + \beta A_i + \eta$  donde  $A_i$  es el vector de pago al que responden los individuos si están dispuestos a pagar antes que la lechuga orgánica y  $\eta$  es la estimación

towards them, as 90.1 % stated that they have consumed this type of product at least once, leaving only 9.9 % who never have done so. No significant differences were found regarding the gender. The main reason for consumption, 53.07 % of the sample said that they consume these products to find better quality in them, 15.2 % said they do so because they like the taste or smell of these products, and 14.4 % due to the belief that organic foods have a higher nutritional content than conventional products, among other reasons.

**Table 3. Sample description.**

**Cuadro 3. Descripción de la muestra.**

Item	Percent	
Gender	Female	58.9
	Male	41.1
Age	18–25	21.4
	26–35	20.9
	36–45	16.6
	46–60	28.4
	60+	12.7
	High Income	12.5
Sociodemographic <sup>1</sup>	Medium-High Income	35.6
	Medium-Low Income	50.5
	High School	47.1
Undergraduate	40.9	
Graduate	3.6	

<sup>1</sup>Approximation to Chilean income stratification.

<sup>1</sup>Aproximación a la estratificación por ingresos de Chile

### Conjoint analysis results

The results show that, concerning the lettuce production system, the organic method obtained the highest utility score. The consumption of organic products showed a positive value reflecting consumers' favorable attitude towards

del error que se supone que tiene una distribución logística.

Para medir la WTP máxima del producto, se creó un mercado hipotético, donde el valor que un individuo asigna a la lechuga extraída está relacionado con su naturaleza orgánica. La DAP media para una función de utilidad indirecta corresponde a:

$$E(WTP) = -\alpha/\beta.$$

Para aplicar lo anterior, el primer paso fue obtener vectores de pago en los que se describiera el producto y sus beneficios, luego se consideró la

cantidad del producto, la forma de pago y la provisión del producto, entre otros aspectos, todo lo cual intenta simular un mercado real (Cuadro 2).

Cuadro 2. Vector de oferta óptimo de WTP para lechuga orgánica, tamaño de muestra y frecuencia de oferta.

them (Table 4). Otherwise, the variety characteristic follows, *Lactuca sativa* L. var. longifolia (Lam) and *Lactuca sativa* L. var. crispa L. The partial utility provided by the lettuce variety variable was lower than that used in the production system. Finally, the price had a negative linear relationship to utility, which is consistent with the theory, as consumers prefer lower prices on the selected products. The price CLP 526 (USD 0.81) delivered the highest partial utility in both cases. Both statistics showed a high correlation between the observed data and the proposed model.

**Resultados y discusión**

**Análisis descriptivo de la muestra**

En cuanto al análisis descriptivo de la muestra, se clasificaron 416 encuestas por nivel socioeconómico. Las definiciones sociodemográficas se enumeran en la Cuadro 3. Del total de encuestados, el 58,9 % eran mujeres, y de estas, el 65,9 % tenían entre 26 y 60 años, pertenecían a los estratos de ingresos medio-bajo y medio-alto, y el 88% de ellos tenían estudios secundarios o universitarios (Cuadro 3).

**Table 4. CA estimations of utility for ranking and rating (score) method.**

**Tabla 4. Estimaciones por CA de la utilidad para el método de ordenamiento y calificación (puntuación).**

		Ranking Model Utility Estimation	Rating Model Utility Estimation
Productionssystem	Conventional	-0.964 (0.148)	-0.508 (0.063)
	Organic	0.964 (0.148)	0.508 (0.063)
Variety	<i>Lactuca sativa</i> L. var. <i>crispa</i> L.	-0.155 (0.148)	-0.059 (0.063)
	<i>Lactuca sativa</i> L. var. <i>longifolia</i> (Lam.)	0.155 (0.148)	0.059 (0.063)
	CLP 526/USD 0.81	-2.826 (0.482)	-1.235 (0.205)
Price	CLP 817/USD 1.25	-4.390 (0.749)	-1.919 (0.318)
	CLP 920/USD 1.41	-4.944 (0.843)	-2.161 (0.359)
	(Constant)	8.764 (0.744)	6.978
	Pearson's R	0.975	0.973
	Price β	-0,005373	-0.002349
	MWTP	\$179.42 <sup>1</sup> (\$0.28 <sup>2</sup> )	\$216.26 <sup>1</sup> (\$0.33 <sup>2</sup> )

In parentheses: standard error; <sup>1</sup>CLP= Chilean peso. <sup>2</sup>USD= USA dolar.

Entre paréntesis: error estándar; <sup>1</sup>CLP= Peso chileno. <sup>2</sup>USD= Dólar estadounidense

When evaluating the relative importance of the attributes, importance score averages were obtained. Here, the price was relatively dominant, followed by the production method, and finally the variety. To estimate the marginal willingness to pay (MWTP), a linear relationship was estimated between the three prices and the estimated coefficients for each of them.

The slope of this estimate allowed us to find a single price coefficient for each case, ranking, and rating (-0.0053 and -0.0023), which was used to estimate the MWTP ( $0.964/0.005373=179.42$  and  $0.508/0.002349=216.26$ ). Therefore, the WTP determined by the ranking method, that is, the premium paid above to obtain an organic lettuce was CLP 179.46 (USD 0.28). This represented 26.73 % of the average market price of conventional lettuce. In terms of rating (score), the marginal WTP for such organic products was CLP 216.26 (USD 0.33), which represented 32.21% of the average market price.

### Contingent valuation results

The results of the double-bounded dichotomous choice model are presented in Table 5. The WTP obtained by the CV method reached CLP 1,027 per head of organic lettuce. The confidence intervals were generated with 99 % confidence and the expected WTP fell between CLP 967 (USD 1.48) and CLP 1,094 (USD 1.68). The price coefficient was negative, which is consistent with the theory, showing that consumers' WTP decreases as item price increases (Cerdea *et al.*, 2010). Both coefficients were significant at the 99 % confidence level.

Adicionalmente, el 98,6% de los encuestados tenía un conocimiento bueno o muy bueno de los productos orgánicos en general y hubo un comportamiento favorable hacia ellos, ya que el 90,1% afirmó haber consumido este tipo de producto al menos una vez, quedando solo el 9,9% que nunca lo han hecho. No se encontraron diferencias significativas en cuanto al género. El principal motivo de consumo, el 53,07% de la muestra dijo que consume estos productos para encontrar mejor calidad en ellos, el 15,2% dijo que lo hace porque les gusta el sabor u olor de estos productos, y el 14,4% por la creencia de que lo orgánico los alimentos tienen un mayor contenido nutricional que los productos convencionales, entre otras razones.

### Resultados del análisis conjunto (CA)

Los resultados muestran que, en cuanto al sistema de producción de lechuga, el método orgánico obtuvo el puntaje de utilidad más alto. El consumo de productos orgánicos mostró un valor positivo reflejando la actitud favorable de los consumidores hacia ellos (Cuadro 4). En caso contrario, sigue la característica de la variedad, *Lactuca sativa* L. var. longifolia (Lam) y *Lactuca sativa* L. var. crispa L. La utilidad parcial proporcionada por la variable variedad de lechuga fue menor que la utilizada en el sistema de producción. Finalmente, el precio tuvo una relación lineal negativa con la utilidad, lo cual es consistente con la teoría, ya que los consumidores prefieren precios más bajos en los productos seleccionados.

Table 5. CV model results.

Tabla 5. Resultados del modelo de CV.

Variable	Traditional Model	Expanded Model
Constant	4,7015 (0.4294)	3.65692 <sup>1</sup> (0.5688)
Bid	-0.00457 <sup>1</sup> (0.0004)	-0.00460 <sup>1</sup> (0.0004)
Income	-	0.42206 <sup>1</sup> (0.1582)
Log-likelihood	-431	-428
99 % Confidence interval	967.2 to 1,094.4 <sup>1</sup>	972.8 to 1,103.9 <sup>1</sup>

Standard error in parenthesis. 1CLP =Chilean pesos  
Coefficients are significant at  $p < 0.05$ . <sup>1</sup>p-value is  $<0.00001$ .

Error estándar entre paréntesis. <sup>1</sup>CLP = Pesos chilenos  
Los coeficientes son significativos a  $p < 0,05$ . <sup>1</sup>valor de  $p$  es  $< 0,00001$ .

This study shows that there is a positive WTP for organic products. The premium price is equal to CLP 355 (USD 0.54), that is, 52.83% higher than the market price for conventionally grown lettuce heads. This could indicate that people care about sustainable development, the environment, and health care, all factors that are considered when buying organic lettuce when it is visible and available in the market.

As mentioned above, there is almost no research on WTP for organic lettuce. The closest research is a study for consumers in México (Hernandez-Ortiz *et al.*, 2019), where the authors estimated the WTP for various organic products, including lettuce, for which a value of 7.5 MXN, equivalent to 0.30 USD, was found, similar to that found in our study. Omotesho *et al.* (2016) examined the WTP for lettuce in supermarkets and specialty stores

El precio CLP 526 (USD 0,81) entregó la utilidad parcial más alta en ambos casos. Ambas estadísticas mostraron una alta correlación entre los datos observados y el modelo propuesto.

A evaluar la importancia relativa de los atributos, se obtuvieron promedios de puntuación de importancia. Aquí, el precio fue relativamente dominante, seguido por el método de producción y finalmente la variedad. Para estimar la disposición marginal a pagar (MWTP), se estimó una relación lineal entre los tres precios y los coeficientes estimados para cada uno de ellos.

La pendiente de esta estimación nos permitió encontrar un coeficiente de precio único para cada caso, ordenamiento y calificación (-0,0053 y -0,0023), que se utilizó para estimar el MWTP ( $0,964 / 0,005373 = 179,42$  y  $0,508 / 0,002349 = 216,26$ ). Por lo tanto, la WTP determinada por el método de ordenamiento, es decir, la prima

in Nigeria, but the value was lower than the regular market price of non-organic lettuce.

Our WTP results exceeded those found for other products, especially fruits. Cerdea *et al.*, (2012) and Cerdea *et al.*, (2015) reported that consumers were willing to pay a premium of 30 % for organic apples and 26.67% for organic pears. However, our results are similar to those obtained by Cerdea *et al.*, (2011) where the WTP reached 51.63% above the price of conventional table grapes.

Using the CV approach, an average WTP was found that exceeded 53.12 % of the average market price. To obtain expanded results, the income variable was incorporated in the model, which showed that the income coefficient has a direct linear relationship with the dependent variable. In other words, if income increases, individuals are more willing to buy the good (income elasticity of the demand is positive).

### Comparison between models

The amount to be paid obtained by the models used in this study was estimated as a percentage of the price premiums based on the current average market price of lettuce, which was estimated by looking at prices paid in farmer's markets and supermarkets, places where Chileans frequently buy food. The premium WTP, for the traditional and expanded CV models, were 52,83% and 53,57%, respectively. In the case of CA, the premium WTP for ranking and rating models were 21,9 % and 26,4 %, respectively.

As mentioned in the literature, the premium WTP tends to be greater

pagada por encima para obtener una lechuga orgánica fue de CLP 179,46 (USD 0,28). Esto representó el 26,73 % del precio medio de mercado de la lechuga convencional. En términos de valoración (puntaje), la WTP marginal de dichos productos orgánicos fue de CLP 216,26 (USD 0,33), lo que representó el 32,21% del precio medio de mercado.

### Resultados de la valoración contingente (CV).

Los resultados del modelo de elección dicotómica de doble acotación se presentan en la Cuadro 5. La WTP obtenida por el método CV alcanzó CLP 1.027 por cabeza de lechuga orgánica. Los intervalos de confianza se generaron con 99 % de confianza y la WTP esperada cayó entre CLP 967 (USD 1,48) y CLP 1.094 (USD 1,68). El coeficiente de precio fue negativo, lo que es consistente con la teoría, que muestra que la WTP de los consumidores disminuye a medida que aumenta el precio del artículo (Cerdea *et al.*, 2010). Ambos coeficientes fueron significativos al nivel de confianza del 99 %.

Este estudio muestra que existe una WTP positiva para los productos orgánicos. El precio de la prima es igual a CLP 355 (USD 0,54), es decir, un 52,83 % más alto que el precio de mercado de las cabezas de lechuga cultivadas de forma convencional. Esto podría indicar que las personas se preocupan por el desarrollo sostenible, el medio ambiente y el cuidado de la salud, todos factores que se consideran al comprar lechuga orgánica cuando está visible y disponible en el mercado.

with the CV method than with the CA approach, which is consistent with our results, because the percentage difference between CV and CA is considerably high. However, our results of ranking and rating estimates provided very similar values in the CA approach, which is consistent with the results mentioned by Hino and Imai (2018).

The differences between a CV and CA can be mainly due to four reasons: first, due to the considerations made by the individuals when they answered the survey, regarding the existence or not of substitute products, which may be more explicit in the CA approach. Second, the psychological aspects involved in the process of choosing goods or services; for the CA approach, individuals chose alternative products with different attributes (including price), whereas in CV they assigned a monetary value.

The third reason is the possibility of ambivalence responses, as can happen with CA. Finally, the uncertainty faced by the individuals, is associated with each of the choices they made (Stevens *et al.*, 2000). It worth pointed out that the results of both methods indicate that consumers value the production of organic lettuce. This is an argument in favor of the cultivation of organic products and the respective certification as a signal to consumers.

## Conclusions

The utilities estimated through the CA method for each attribute indicates that the variety *Lactuca sativa* L.

Como se mencionó anteriormente, casi no hay investigaciones sobre la WTP para la lechuga orgánica. La investigación más cercana es un estudio para consumidores en México (Hernandez-Ortiz *et al.*, 2019), donde los autores estimaron la DAP de varios productos orgánicos, incluida la lechuga, para lo cual se encontró un valor de 7,5 MXN, equivalente a 0,30 USD, similar al encontrado en nuestro estudio. Omotesho *et al.*, (2016) examinaron la DAP de la lechuga en los supermercados y tiendas especializadas en Nigeria, pero el valor era más bajo que el precio normal de mercado de la lechuga no orgánica.

Nuestros resultados de WTP superaron los encontrados para otros productos, especialmente frutas. Cerde *et al.*, (2012) y Cerde *et al.*, (2015) informaron que los consumidores estaban dispuestos a pagar una prima del 30 % por las manzanas orgánicas y del 26,67 % por las peras orgánicas. Sin embargo, nuestros resultados son similares a los obtenidos por Cerde *et al.*, (2011) donde la DAP alcanzó un 51,63 % por encima del precio de la uva de mesa convencional.

Utilizando el enfoque de CV, se encontró una WTP media que excedía el 53,12% del precio medio de mercado. Para obtener resultados expandidos, se incorporó al modelo la variable ingreso, que mostró que el coeficiente de ingreso tiene una relación lineal directa con la variable dependiente. En otras palabras, si el ingreso aumenta, los individuos están más



var. *crispa.*, produced organically and at the lowest observed price, is the most preferred by consumers. Additionally, it is important to mention that consumers have a WTP for organic lettuces, even paying a 50 % premium on top of what they would pay for conventional lettuce.

Organic products are most appreciated by a specific group of consumers, mainly those with higher incomes that have a greater probability to pay a premium price for organic lettuces. Therefore, organic lettuce producers and marketers should focus their promotion strategies mainly on high socioeconomic segments and sales in higher income countries. Additionally, no significant differences were found regarding the gender, this means that lettuce producers would not need a gender-differentiated promotion strategy.

Finally, the main reasons to consume this type of product are, firstly, its higher quality, followed by its particular taste or smell, and finally, it has better nutritional contents. Therefore, lettuce growers can use the estimated premium price as a reference when making decisions about production and pricing.

### *End of English Version*

---

dispuestos a comprar el bien (la elasticidad ingreso de la demanda es positiva).

#### **Comparación entre modelos**

El monto a pagar obtenido por los modelos utilizados en este estudio se estimó como un porcentaje de los

sobrepuestos con base en el precio promedio de mercado actual de la lechuga, el cual se estimó observando los precios pagados en los mercados de agricultores y supermercados, lugares donde los chilenos con frecuencia compran comida. La WTP premium, para los modelos CV tradicional y expandido, fue de 52,83% y 53,57%, respectivamente. En el caso de CA, la WTP premium para los modelos de ordenamiento y calificación fue de 21,9% y 26,4%, respectivamente.

Como se menciona en la literatura, la WTP premium tiende a ser mayor con el método CV que con el enfoque CA, lo cual es consistente con nuestros resultados, porque la diferencia porcentual entre CV y CA es considerablemente alta. Sin embargo, nuestros resultados de las estimaciones de ordenamiento y calificación proporcionaron valores muy similares en el enfoque de CA, lo cual es consistente con los resultados mencionados por Hino e Imai (2018).

Las diferencias entre CV y AC pueden deberse principalmente a cuatro motivos: primero, a las consideraciones que hicieron los individuos al contestar la encuesta, sobre la existencia o no de productos sustitutos, que pueden ser más explícitos en el enfoque de AC. En segundo lugar, los aspectos psicológicos involucrados en el proceso de elección de bienes o servicios; para el enfoque CA, los individuos eligieron productos alternativos con diferentes atributos (incluido el precio), mientras que en CV asignaron un valor monetario.

La tercera razón es la posibilidad de respuestas de ambivalencia, tal como

puede suceder con la AC. Finalmente, la incertidumbre que enfrentan los individuos, está asociada a cada una de las elecciones que hicieron (Stevensa et al., 2000). Cabe señalar que los resultados de ambos métodos indican que los consumidores valoran la producción de lechuga orgánica. Este es un argumento a favor del cultivo de productos orgánicos y a la respectiva certificación como indicación para los consumidores.

## Conclusiones

Las utilidades estimadas mediante el método CA para cada atributo indican que la variedad *Lactuca sativa* L. var. crispa, producida orgánicamente y al precio más bajo observado, es la más preferida por los consumidores. Además, es importante mencionar que los consumidores tienen una WTP para lechugas orgánicas, incluso pagando un 50 % más de lo que pagarían por la lechuga convencional.

Los productos orgánicos son más apreciados por un grupo específico de consumidores, principalmente aquellos con mayores ingresos que tienen una mayor probabilidad de pagar un precio superior por las lechugas orgánicas. Por lo tanto, los productores y comercializadores de lechuga orgánica deben enfocar sus estrategias de promoción principalmente en los segmentos socioeconómicos altos y las ventas en los países de ingresos más altos. Adicionalmente, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al género, esto significa que los

productores de lechuga no necesitarían una estrategia de promoción diferenciada por género.

Finalmente, las principales razones para consumir este tipo de productos son, en primer lugar, su mayor calidad, seguido de su sabor u olor particular, y por último, su mejor contenido nutricional. Por lo tanto, los productores de lechuga pueden usar el precio de la prima estimada como referencia al tomar decisiones sobre producción y precios.

## Cited literature

- Ahmed, J., T. Tefera and G.T. Kassie. 2020. Consumers' preference and willingness to pay for enriched snack product traits in Shashamane and Hawassa cities, Ethiopia. *Agricultural and Food Economics*, 8(14):1-20. <https://doi.org/10.1186/s40100-020-00157-1>
- Bhattarai, K. 2019. Consumers' Willingness to Pay for Organic Vegetables: Empirical Evidence from Nepal. *Journal of Scientific Papers, Economics & Sociology* 12(3): 132-146. <https://doi.org/10.14254/2071-789X.2019/12-3/9>
- Britwum, K. and A. Yiannaka. 2019. Labeling food safety attributes: to inform or not to inform?. *Agricultural and Food Economics*, 7(4):1-21. <https://doi.org/10.1186/s40100-019-0123-y>
- Cerdea, A., L. García, J. Cancino and A. Nunez. 2011. Preferences and willingness to pay for table grapes in the region of Maule, Chile. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(3): 784-790. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000300012>
- Cerdea, A., L. Garcia, S. Ortega-Farias and A. Ubilla. 2012. Consumer preferences and willingness to pay for organic apples. *Ciencia e Investigación Agraria*, 39(1): 47-59. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202012000100004>

- Cerda, A., L. García, F. Tolosa and V. García. 2015. Preferences and willingness to pay for organic pears among high-income people in the Metropolitan Region of Santiago, Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*, 42(2): 181-189. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202015000200005>
- Cerda, A.A., L.Y. García, F. Tolosa and V. García. 2014. Preferencias y disposición a pagar por manzanas orgánicas en la Región Metropolitana de Santiago de Chile. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 31(2): 274-289. <https://cutt.ly/xQydLeu>
- Cerda, A., García, L., Bahamondez, A., & Poblete, V. (2010). Comparison of Willingness To Pay (WTP) for an Improvement in Air Quality between Users and Nonusers of Firewood in the City of Talca (Chile). *Lecturas de Economía*, (72), 195-211. EID: 2-s2.0-84875569915 <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-875569915&partnerID=MN8TOARS>
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2020. Production quantities of Lettuce and chicory by country. Available on: <https://cutt.ly/yQyhrG5> Date of consultation: January 2021.
- Ferreira, S.D., A. Rial, E. Picón and J. Varela. 2009. Efecto del orden de presentación de los atributos sobre los resultados del Análisis Conjunto. *Metodología de Encuestas*. 11:103-119. <https://cutt.ly/AQyfeZy>
- Ghimire, M., T.A. Boyer, C.J. Chung and J.Q. Moss. 2016. Consumers' Shares of Preferences for Turfgrass Attributes Using a Discrete Choice Experiment and the Best-Worst Method. *Hortscience*. 51(7):892-898. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.51.7.892>
- Hernandez-Ortiz, J., J. Trujillo-Murillo and M. Martinez-Damian. 2019. Disposición a pagar por productos orgánicos en Texcoco, Estado de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(7): 1685-1691. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.926>
- Hino, A. and R. Imai. 2018. Ranking and Rating: Neglected Biases in Factor Analysis of Postmaterialist Values. *International Journal of Public Opinion Research*, 31(2):368-381. <https://doi.org/10.1093/ijpor/edy007>
- Jouzi, Z., H. Azadi, F. Taheri, K. Zarafshani, K. Gebrehiwot, S. Van Passel and P. Lebailly. 2017. Organic farming and small-scale farmers: Main opportunities and challenges. *Ecological Economics*. 132(1):144-154. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2016.10.016>
- Kushwah, S., A. Dhir, M. Sagar and B. Gupta. 2019. Determinants of organic food consumption. A systematic literature review on motives and barriers. *Appetite*. 143(1):104402. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2019.104402>
- Li, R., H.-Y. Lee, Y.-T. Lin, C.-W. Liu and P.F. Tsai. 2019. Consumers' willingness to pay for organic foods in China: Bibliometric review for an emerging literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(10):1713. <https://doi.org/10.3390/ijerph16101713>
- Lusk, J.L. and D. Hudson. 2004. Willingness-to-pay estimates and their relevance to agribusiness decision making. *Review of Agricultural Economics*, 26(2):152-169. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9353.2004.00168.x>
- Nishi, I.F., 2017. Consumer willingness to pay for local vegetables grown in a controlled environment: the case of lettuce. *Applied Economics and Management*. Cornell University, Cornell University Library. p.54. Available on: <https://doi.org/10.7298/X4X63K37> Date of consultation: July 12 2021.
- Omotesho, O.A., A. Falola, K.F. Omotesho and A.S. Abikoye. 2016. Consumers' Willingness to Pay for Lettuce in Supermarkets and Specialty Shops in Ilorin Metropolis, *Nigeria Centrepont Journal (Science Edition)*. 22(1): 36-49. <https://cutt.ly/qQyqgTA>
- Pham, T.H., T.N. Nguyen, T.T.H. Phan and N.T. Nguyen. 2019. Evaluating the purchase behaviour of organic food by young consumers in an emerging market economy. *Journal of Strategic Marketing*, 27(6): 540-556. <https://doi.org/10.1080/0965254X.2018.1447984>





- Rahman, S., M. Mele, Y. Lee and M. Islam. 2021. Consumer Preference, Quality, and Safety of Organic and Conventional Fresh Fruits, Vegetables, and Cereals. *Foods*. 10(1):105. <https://doi.org/10.3390/foods10010105>
- Ranjbarshamsi, H., M. Najafabadi and S. Hosseini. 2016. Factors Influencing Consumers' Attitudes Toward Organic Agricultural Products. *Journal of Agricultural & Food Information* 17(2): 110-119. <https://doi.org/10.1080/10496505.2016.1176574>
- Shatilov, M., Razin, A. and Ivanova, M. 2019. Analysis of the world lettuce market. IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*. 395(1):12053. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/395/1/012053>
- Schleenbecker, R. and Hamm, U. (2013). Consumers' perception of organic product characteristics. A review. *Appetite*. 71(1):420-429. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2013.08.020>
- Stevens, T. H., Belkner, R., Dennise, D., Kittredge, D. and Willisa, C. 2000. Comparison of contingent valuation and conjoint analysis in ecosystem management. □ *Ecological Economics*, 32(1): 63-74. [https://doi.org/10.1016/S0921-8009\(99\)00071-3](https://doi.org/10.1016/S0921-8009(99)00071-3)
- Wang, Y., Zhu, Z. and Chu, F. 2017. Organic vs. Non-Organic Food Products: Credence and Price Competition. *Sustainability*. 9(4):545. <https://doi.org/10.3390/su9040545>
- Willer, H., Schlatter, B., Travinicek, J., Kemper, L. and Lernoud, J. E. (2020). The World of Organic Agriculture - Statistics & Emerging Trends 2020. Research Institute of Organic Agriculture (FiBL), Frick, Switzerland, p.337. <https://cutt.ly/dQyhsCB>

## The price elasticity of the demand and revenue increase for some Mexican planting seeds

La elasticidad precio de la demanda e ingresos para algunas semillas mexicanas

A elasticidade-preço da demanda e receita para algumas sementes de plantio no México

Sergio Orozco Cirilo<sup>1\*</sup>, Juan Manuel Vargas Canales<sup>1</sup>, Sergio Ernesto Medina Cuéllar<sup>2</sup> and Nicasio García Melchor<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Guanajuato. México. Campus Celaya Salvatierra. División de Ciencias Sociales y Administrativas. Departamento de Estudios Sociales. Email: (SO) [orozcosergio@ugto.mx](mailto:orozcosergio@ugto.mx), ; (JV) [jm.vargas@ugto.mx](mailto:jm.vargas@ugto.mx), ; (NG) [nicasio@ugto.mx](mailto:nicasio@ugto.mx), . <sup>2</sup>Universidad de Guanajuato. *Campus* Irapuato-Salamanca, Departamento de Arte y Empresa. Email: [se.medina@ugto.mx](mailto:se.medina@ugto.mx), .

### Abstract

The study of the price elasticity of demand (PED) has been and is a current research topic, as it greatly helps the managers of companies to make decisions about the price of their products and the expected repercussions in changing them. The objective of this study was to estimate PED and its impacts on the variation of income (VI) of six planting seed crops from Mexico, such as yellow corn, other corn (except yellow and sweet corn), sorghum, chickpea, pumpkin and cucumber. The data were gathering from the Foreign Agriculture Service (FAS) (1998-2018 period) through the tables provided and published on the Internet (secondary data). In this study, the arc method was applied to calculate PED and  $VI = ((Pf * Qf * 100) / (Pi * Qi)) - 100$ . Five of six the planting seed products have a relatively elastic demand price in most of the years, on the contrary the revenue increase had positive and negative values, without a defined trend. Sorghum planting seed has in some cases elastic demand and in other inelastic demand. It is concluded that there are no clear effects of the PED on the sales revenue of the aforementioned products; an aspect that contradicts the theory of PED and its impact on income.

**Key words:** Crop seeds, agricultural prices, export products.

Received: 26-05-2021 • Accepted: 10-07-2021.

\*Corresponding autor. Email: [orozcosergio@ugto.mx](mailto:orozcosergio@ugto.mx)

## Resumen

El estudio de la elasticidad precio de la demanda ha sido y es un tema de investigación actual, pues ayuda enormemente a los gestores de las empresas a tomar decisiones sobre el precio de sus productos y las repercusiones esperadas en el cambio de éstas. El objetivo de este estudio fue estimar la EPD y sus impactos en la variación del ingreso (VI) de seis semillas para la siembra de México, como maíz amarillo, otro maíz (excepto maíz amarillo y dulce), sorgo, garbanzos, calabaza y pepino. Los datos se recopilaron del Servicio de Agricultura Extranjera (FAS) (período 1998-2018) a través de las tablas proporcionadas y publicadas en Internet (datos secundarios). En este estudio, el método de arco se aplicó para calcular EPD y  $VI = ((Pf * Qf * 100) / (Pi * Qi)) - 100$ . Cinco de seis semillas para la siembra tienen un precio de demanda relativamente elástico en la mayoría de los años, por el contrario, el aumento de los ingresos tuvo valores positivos y negativos, sin una tendencia definida. El Sorgo tuvo en algunos casos una demanda elástica y en otros una demanda inelástica. Se concluye que no hay efectos claros de la EPD en los ingresos por ventas de los productos antes mencionados; aspecto que contradice la teoría EPD y su impacto en el ingreso.

**Palabras clave:** Semillas de siembra, precios agrícolas, productos de exportación.

## Resumo

O estudo da elasticidade-preço da demanda tem sido e é um tema atual de pesquisa, pois ajuda muito os gestores das empresas na tomada de decisões sobre o preço de seus produtos e as repercussões esperadas em sua mudança. O objetivo deste estudo foi estimar a EPD e seus impactos na variação do rendimento (VI) de seis sementes para plantio no México, como milho amarelo, outro milho (exceto milho amarelo e doce), sorgo, grão de bico, abóbora e pepino. Os dados foram coletados junto ao Foreign Agriculture Service (FAS) (período 1998-2018) por meio de tabelas disponibilizadas e publicadas na Internet (dados secundários). Neste estudo, o método do arco foi aplicado para calcular EPD e  $VI = ((Pf * Qf * 100) / (Pi * Qi)) - 100$ . Cinco das seis sementes para plantio têm um preço de demanda relativamente elástico na maioria dos anos ao contrário, o aumento da renda teve valores positivos e negativos, sem tendência definida. O sorgo teve em alguns casos uma demanda elástica e em outros uma demanda inelástica. Conclui-se que não há efeitos claros da EPD nas receitas de vendas dos referidos produtos; aspecto que contradiz a teoria do EPD e seu impacto na receita.

**Palavras-chave:** Sementes, preços agrícolas, produtos de exportação.

## Introduction

The commercial relationship between Mexico and the United States of America (USA) has improved more and more over time (Licona and Correa, 2020). Mexican exports of products to the United States totaled US\$ 32,095 million in May, a year-on-year increase of 9 % (De la Fuente, 2014). Seed exports worldwide have experienced continuous growth over the past few years, reaching US\$ 10,543 million in 2012, where the USA is the main importer of seeds with 14% of the total (De la Fuente, 2014). According to ISF (2018a and 2018b) for 2017, Mexico exported 740 t of vegetable crop seeds for a value of 17 million US\$ and imported 1852 t for a value of 323 million US\$. The Asociación Mexicana de Semilleros, AC (AMSAC) indicates that in Mexico more than 300 varieties of seeds are offered for the main crops in 2012. Corn, sorghum, rice, chili, tomato and tomatillo seeds are produced (CEDRSSA, 2015).

The national seed industry, especially corn and sorghum, is the one that currently mostly satisfies the national market (CEDRSSA, 2015), opening the possibility to export seeds of these crops (Gobierno del estado de Jalisco, 2015). It is important to note that the production of seeds in Mexico is in the hands of private sector, both national and international, that participates with 94 % of the market. Among the strengths of the seed sector are the genetic diversity of the country, the center of origin of various species and the existence of

## Introducción

La relación comercial entre México y los Estados Unidos de América (EE.UU.) ha mejorado cada vez más con el tiempo (Licona y Correa, 2020). Las exportaciones mexicanas de productos a Estados Unidos totalizaron US\$ 32,095 millones en mayo con un aumento interanual del 9 % (De la Fuente, 2014). Las exportaciones de semillas en todo el mundo han experimentado un crecimiento continuo en los últimos años, alcanzando los US\$ 10.543 millones en 2012, donde EEUU es el principal importador de semillas con el 14% del total (De la Fuente, 2014). Según ISF (2018a y 2018b) para 2017, México exportó 740 t de semillas para cultivos vegetales por un valor de 17 millones de US\$ e importó 1852 t por un valor de 323 millones de US\$. La Asociación Mexicana de Semilleros, AC (AMSAC) indica que para 2012, en México se ofrecieron más de 300 variedades de semillas para los principales cultivos. Se producen semillas de maíz, sorgo, arroz, chile, tomate y tomatillo (CEDRSSA, 2015).

La industria nacional de semillas, especialmente maíz y sorgo, es la que actualmente satisface mayormente al mercado nacional (CEDRSSA, 2015), abriendo la posibilidad de exportar semillas de estos cultivos (Gobierno del estado de Jalisco, 2015). Es importante destacar que la producción de semillas en México está en manos del sector privado, tanto nacional como internacional, que participa con el 94 % del mercado. Entre las fortalezas del sector productivo de

institutions that are part of the seed market (Mastretta-Yanes *et al.*, 2019). In the case of corn, it is proposed to promote the participation of small corn seed producing companies at local and regional levels (Luna *et al.*, 2012).

The price elasticity of the demand is a measure to quantify the percentage variation in the demanded quantity, with respect to the percentage changes in prices along the demand curve (Samuelson and Nordhaus, 2005; Krugman and Wells, 2006). The study of the price elasticity of demand has been and is a current research topic, as it greatly helps the managers of companies to make decisions about the price of their products and the expected repercussions in changing them (Hernández and García, 2014). More specifically, price elasticity in the seed-planting sector varies significantly depending on multiple factors: land ownership, period of time, seed policies, seed producer profile, etc. (Mora *et al.*, 2014).

The main advantage offered by the calculation of the price elasticity of demand (PED) is that it allows the seed companies to anticipate the behavior of the market in the face of a variation of factors such as the price of goods and services. An increase in the price of a good can increase the price of other goods, it is convenient for seed companies to calculate as accurately as possible how this situation will affect their sales and in this way be able to carry out the necessary adjustments so that this impacts the minimum to the company.

semillas, se encuentran la diversidad genética del país, el centro de origen de diversas especies y la existencia de instituciones que forman parte del mercado de semillas (Mastretta-Yanes *et al.*, 2019). En el caso del maíz, se propone promover la participación de pequeñas empresas productoras de semillas de maíz a nivel local y regional (Luna *et al.*, 2012).

La elasticidad precio de la demanda es una medida para cuantificar la variación porcentual en la cantidad demandada, con respecto a los cambios porcentuales en los precios a lo largo de la curva de demanda (Samuelson y Nordhaus, 2005; Krugman y Wells, 2006). El estudio de la elasticidad precio de la demanda ha sido y es un tema de investigación actual, ya que ayuda enormemente a los directivos de las empresas a tomar decisiones sobre el precio de sus productos y las repercusiones esperadas en su cambio (Hernández y García, 2014). Más específicamente, la elasticidad de los precios en el sector de semillas para la siembra varía significativamente dependiendo de múltiples factores: propiedad de la tierra, período de tiempo, políticas de semillas, perfil del productor de semillas, entre otros (Mora *et al.*, 2014).

La principal ventaja que ofrece el cálculo de la elasticidad precio de la demanda (PED) es que permite a las empresas de semillas anticiparse al comportamiento del mercado frente a una variación de factores como el precio de los bienes y servicios. Un aumento en el precio de un bien puede aumentar el precio de otros bienes, es conveniente que



If the elasticity is less than 1.0, it is inelastic, while demand is elastic when it is greater than -1.0 (Herrera, 2013; Suárez, 2017). Referentially, in Herrera's approach the price point elasticity is determined by a differential calculation, which yields also negative values. This is due to the inverse relationship between price and demand. In the case when the PED tends to minus infinity, it is perfectly elastic; however, the original focus widely used in the scope of PED is that of Samuelson and Norhdaus (2005), and Krugman and Wells (2006). In both approaches, they use the absolute values, excluding negative values. This is the methodology used in this work.

The main purpose of this research is to validate the evolutionary impact price elasticity of demand on the net income of various seed of Mexican crops seeds, during the period 1998-2018. For this, the price elasticity of the demand and net income of corn (*Zea mays* L.), sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), chickpea (*Cicer arietinum* L.), pumpkin (*Cucurbita maxima* L.) and cucumber seeds (*Cucumis sativus* L.) were estimated in the period under consideration.

## Materials and methods

This research is a correlational-evolutive type investigation, since we have obtained the relations and correlations between prices and incomes for each PED detected in a period of 20 years.

las empresas de semillas calculen con la mayor precisión posible cómo esta situación afectará sus ventas y de esta manera poder realizar los ajustes necesarios para que esto impacte minimamente a la empresa.

Si la elasticidad es menor que 1,0, esta es inelástica, mientras que la demanda es elástica cuando es mayor que -1,0 (Herrera, 2013; Suárez, 2017). Referencialmente, en el enfoque de Herrera (2013) la elasticidad de cada punto de precio está determinada por un cálculo diferencial, que también produce valores negativos. Esto se debe a la relación inversa entre precio y demanda. En el caso de que el EPD tienda a menos infinito, es perfectamente elástico; sin embargo, el enfoque original ampliamente utilizado en el alcance de la EPD, es el de Samuelson y Norhdaus (2005), y Krugman y Wells (2006). En ambos enfoques, se utilizan los valores absolutos, excluyendo los valores negativos. Esta es la metodología utilizada en este trabajo.

El objetivo principal de esta investigación es validar el impacto evolutivo de la elasticidad precio de la demanda sobre el ingreso neto de diversas semillas de cultivos mexicanos, durante el período 1998-2018. Para ello, en el período considerado, se estimó la elasticidad precio de la demanda y los ingresos netos de las semillas de maíz (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), garbanzo (*Cicer arietinum* L.), calabaza (*Cucurbita*

### Obtaining and analyzing data

To calculate the price elasticity of the demand and revenue increase of yellow corn, other corns, sorghum, chickpea, pumpkin and cucumber, it was necessary to get the data of exports in dollars and volume in metric tons of these six planting seeds. These data were obtained from the Foreign Agriculture Service (FAS, 2019) of the United States Department of Agriculture (USDA) for the 1998-2018 period through the tables it provided and published on Internet (Secondary data). Using the information, the elasticity matrix was constructed, which will be utilized in the analysis. This elasticity matrix is created based on the reference export price in dollars for each t. and the volume exported in t.

It is indicated, that exports expressed in millions of dollars, will be considered as the overall average price, by which these planting seeds were acquired, since the price at which the planting seeds of export are negotiated and attained, it is used to analyze in quantitative terms how the market of a certain product adapts or adjusts to variations in the price of the same accounted for in millions of dollars, besides these prices vary according to a change in the real exchange rate and the record of tons of export will be equal to the average annual quantity demanded of these planting seeds. Based on this, the estimations were determined according to the formula of the price elasticity of the demand for a product. The price elasticity of demand can be estimated using the arc method as follows:

*maxima* L.) y pepino (*Cucumis sativus* L.).

### Materiales y métodos

Esta investigación es de tipo correlacional-evolutiva, ya que se han obtenido las relaciones y correlaciones entre precios e ingresos para cada PED detectado en un período de 20 años.

#### Obtención y análisis de datos

Para calcular la elasticidad precio de la demanda y el aumento de ingresos del maíz amarillo, otros maíces, sorgo, garbanzo, calabaza y pepino, fue necesario obtener los datos de exportaciones en dólares y volumen en toneladas métricas de estas seis semillas de cultivo. Estos datos fueron obtenidos del Foreign Agriculture Service (FAS, 2019) del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) para el período 1998-2018 por medio de los cuadros que se publicaron en Internet (datos secundarios). Con la información se construyó la matriz de elasticidad, que será utilizada en el análisis. Esta matriz de elasticidad se crea con base en el precio de exportación de referencia en dólares por cada t y el volumen exportado en t.

Las exportaciones expresadas en millones de dólares, serán consideradas como el precio promedio global por el cual se adquirieron estas semillas de cultivo ya que, el precio al que se negocian y alcanzan las semillas de exportación se utiliza para analizar en términos cuantitativos cómo el mercado de un determinado producto se adapta o ajusta a variaciones en el precio del

$$E_d = \frac{\ddot{A}\%Q}{\ddot{A}\%P} \tag{1.1}$$

and,

$$E_d = \frac{\frac{\Delta Q}{Q_1}}{\frac{\Delta P}{P_1}} = \frac{P_1}{Q_1} \times \frac{\Delta Q}{\Delta P} = \left(\frac{P_1}{Q_1}\right) \times \left(\frac{Q_2 - Q_1}{P_2 - P_1}\right) \tag{1.2}$$

where:  $P_1$  = Initial price,  $P_2$  = Final price,  $Q_1$  = Initial quantity and  $Q_2$  = Final quantity

It must be pointed out, that to apply the above equation, it is necessary to know the quantities demanded at the different prices, but all the other factors that influence the consumers demand remain constant (*ceteris paribus* or remaining the rest constant), (Samuelson and Nordhaus, 2005; MasterIT.ie., 2006; Miller and Meiners, 1990).

Total income (TI) can be defined as the unit price multiplied by the quantity demanded, since this is the quantity of income received by any seller in a product, who charges a unit price equal to P, multiplied by the total of units sold, Q. ( $TI = P * Q$ ) (Samuelson and Nordhaus, 2005; Miller and Meiners, 1990).

The revenue increase (RI) can be calculated in both initial and final state, using the equation of the total income formula as follow (Omni Calculator, 2019):

$$RI = \frac{(P_2 \cdot Q_2 \cdot 100)}{P_1 \cdot Q_1} - 100 \tag{1.3}$$

where:  $P_2$ ,  $P_1$ ,  $Q_2$  and  $Q_1$  as above. The data of exports and volume

mismo, contabilizado en millones de dólares, además estos precios varían de acuerdo a un cambio en el tipo de cambio real y el récord de toneladas de exportación será igual a la cantidad promedio anual demandada de estas semillas de cultivo. Con base en esto, las estimaciones se determinaron de acuerdo con la fórmula de la elasticidad precio de la demanda de un producto. La elasticidad precio de la demanda se puede estimar utilizando el método del arco, de la siguiente manera:

$$E_d = \frac{\ddot{A}\%Q}{\ddot{A}\%P} \tag{1.1}$$

y,

$$E_d = \frac{\frac{\Delta Q}{Q_1}}{\frac{\Delta P}{P_1}} = \frac{P_1}{Q_1} \times \frac{\Delta Q}{\Delta P} = \left(\frac{P_1}{Q_1}\right) \times \left(\frac{Q_2 - Q_1}{P_2 - P_1}\right) \tag{1.2}$$

donde:

$P_1$  = Precio inicial,  $P_2$  = Precio final,  $Q_1$  = Cantidad inicial and  $Q_2$  = Cantidad final

Cabe señalar, que para aplicar la ecuación anterior es necesario conocer las cantidades demandadas a los diferentes precios, pero todos los demás factores que influyen en la demanda de los consumidores se mantienen constantes (*ceteris paribus* o manteniéndolo el resto constante), (Samuelson and Nordhaus, 2005; MasterIT.ie., 2006; Miller and Meiners, 1990).

El ingreso total (IT) se puede definir como el precio unitario multiplicado por la cantidad demandada, ya que esta es la cantidad de ingreso que recibe cualquier vendedor de un

of the six planting seeds were introduced in the Excel software for processing, analyzing and to calculate the price elasticity of the demand and revenue increase, both parameters were estimated using the on line calculators: MasterIT.ie. (2006) and Omni Calculator (2019), respectively. As was mentioned earlier, these on-line calculators are based on formulae 1.3, and consist in multiplying the price by the quantity of the final period times 100. Then, the obtained value is divided, by the product of the price by the quantity of the initial period. Finally, this result is subtracted by 100. This procedure was employed by Samuelson and Nordhaus (2005). Once the PED and incomes were calculated for each year, we proceed to compare the results with respect to Table 1. Finally, our results are discussed.

producto, que cobra un precio unitario igual a  $P$ , multiplicado por el total de unidades vendidas,  $Q$ . ( $TI = P * Q$ ) (Samuelson and Nordhaus, 2005; Miller and Meiners, 1990).

El aumento de los ingresos (RI) se puede calcular tanto en el estado inicial como en el final, utilizando la ecuación de la fórmula de ingresos totales de la siguiente manera (Omni Calculator, 2019):

$$RI = \frac{(P_2 \cdot Q_2 \cdot 100)}{P_1 \cdot Q_1} - 100 \quad (1.3)$$

donde:  $P_2$ ,  $P_1$ ,  $Q_2$  and  $Q_1$  ya se definieron anteriormente.

Los datos de exportaciones y volumen de las seis semillas de siembra se introdujeron en el software Excel para procesar, analizar y calcular la elasticidad precio de la demanda y el aumento de ingresos,

**Table 1. Summary of the fundamental concepts used in this work.**

**Cuadro 1. Resumen de los conceptos fundamentales utilizados en este trabajo.**

Elasticity of the demand	Description	Definition	Influence on incomes
Greater than 1 ( $E_p > 1$ )	Elastic demand	Percentage variation of demanded quantity greater than percentage price variation	Incomes increase when price decreases
Equal to 1 ( $E_p = 1$ )	Unitary Elastic demand	Percentage variation of demanded quantity equal to percentage price variation	Incomes do not vary when price decreases
Less than 1 ( $E_p < 1$ )	Inelastic demand	Percentage variation of demanded quantity less than percentage price variation	Incomes decrease when price decreases

Source: Samuelson and Nordhaus (2005).

Fuente: Samuelson and Nordhaus (2005).

Pearson's correlation coefficients were calculated for the export reference price with the revenue increase and with the exported volume, using years as the common variable. They were calculated for all six Mexican planting seeds. The significance of Pearson's correlation coefficients was determined at 0.01, 0.05, or 0.10 level of probability.

## Results and discussion.

### Yellow corn

The price elasticity of demand for planting seeds of yellow corn varied from 0.07 to 28.76, demand was relatively inelastic in four years, but was relatively elastic in ten years and it was unity elasticity in four years (Table 1). It can be said that the price elasticity of demand was mostly elastic. Table 2 shows the revenue increase, it was negative in 11 years and positive in five years. The highest revenue increase was got in the year 2009 (711.69%) and the lowest in the years 2002 and 2005 (-100.00%). Table 2 shows the relation of exported value and export referential price, as it can be seen the exported volume was very variable. The highest exported quantity was achieved in the year 2010 (218.1 t) and the lowest in the year 2003 (5.1 t). In the relation to the export referential price, it was highest in the year 2017 (5,714.0 US\$/t) and the lowest in the year 2004 (258.3 US\$/t). Also, the export reference price was very variable. The exports were not done in the years 2002 and 2005 to 2007, but since 2008, the exports were constant and from year 2013 the export reference price was higher than 3,000 US\$/t.

ambos parámetros se estimaron mediante las calculadoras en línea: MasterIT.ie. (2006) y Omni Calculator (2019), respectivamente. Como se mencionó anteriormente, estas calculadoras en línea se basan en la fórmula 1.3, y consisten en multiplicar el precio por la cantidad del período final por 100. Luego, el valor obtenido se divide, por el producto del precio por la cantidad de el período inicial. Finalmente, este resultado se resta por 100. Este procedimiento fue empleado por Samuelson y Nordhaus (2005). Una vez calculados las EPD y los ingresos para cada año, se procede a comparar los resultados con respecto a la Cuadro 1. Finalmente, se discuten los resultados.

Los coeficientes de correlación de Pearson se calcularon para el precio de referencia de exportación con el aumento de los ingresos y con el volumen exportado, utilizando los años como variable común. Estos, fueron calculados para las seis semillas de cultivo mexicanas. La significancia de los coeficientes de correlación de Pearson se determinó para un nivel de probabilidad de 0,01; 0,05 ó 0.10.

## Resultados y discusión

### Maíz

La elasticidad precio de la demanda para sembrar semillas de maíz amarillo varió de 0,07 a 28,76, la demanda fue relativamente inelástica en cuatro años, pero fue relativamente elástica en diez años y fue elasticidad unitaria en cuatro años (Cuadro 2). Se puede decir que la elasticidad precio de la demanda fue mayoritariamente

**Table 2. Price elasticity of the demand, revenue increase and other economic variables of planting seeds of yellow corn exported from Mexico to the United States of America.**

**Cuadro 2. Elasticidad precio de la demanda, incremento de ingresos y otras variables económicas de semillas de maíz amarillo para siembra exportadas de México a Estados Unidos de America.**

Variable †	Years 1999-2008									
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
ERP(US\$/t)	1,981.4	1,405.0	2,042.1		1,711.6	258.3				2,404.9
EV (t)	120.4	130.5	69.8		5.1	28.0				31.2
<b>PED</b>	<b>1.06</b>	<b>0.24</b>	<b>1.64</b>	<b>1.00</b>	<b>1.00</b>	<b>0.94</b>	<b>1.00</b>			<b>1.00</b>
<b>RI (%)</b>	<b>-3.13</b>	<b>-23.14</b>	<b>-22.26</b>	<b>-100.00</b>		<b>-17.15</b>	<b>-100.00</b>			

Variable †	Years 2009-2018									
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
ERP(US\$/t)	2,792.4	2,636.4	1,845.2	3,218.0	3,767.3	3,682.4	3,315.2	3,045.1	5,714.0	2,529.4
EV (t)	218.1	39.7	211.2	83.7	52.8	104.3	89.0	152.1	158.7	137.7
<b>PED</b>	<b>10.06</b>	<b>24.08</b>	<b>3.87</b>	<b>1.59</b>	<b>2.88</b>	<b>28.76</b>	<b>1.51</b>	<b>6.16</b>	<b>0.07</b>	<b>0.18</b>
<b>RI (%)</b>	<b>711.67</b>	<b>-82.81</b>	<b>272.34</b>	<b>-30.88</b>	<b>-26.15</b>	<b>93.09</b>	<b>-23.18</b>	<b>56.98</b>	<b>95.79</b>	<b>-61.59</b>

†ERP: Export reference price; EV: Exported volume; PED: Price elasticity of the demand and RI: Revenue increase. Source of ERP and EV data: FAS (2019).

‡ERP: Precio de Exportación de Referencia; EV: Volumen Exportado; PED: Elasticidad precio de la Demanda y RI: Incremento de los Ingresos. Fuente de datos de ERP y EV: FAS (2019).

Planting seeds of corn (except yellow and sweet corns seeds) had a fluctuating demand, since it varied from 0.07 (the year 2004) to 54.93 (the year 2001). There were eight inelastic demands and 12 elastic demands. This means that there was not a trend in the elasticity, even two inelastic demands were above 1.0 only for 0.07. In relation to revenue increase, it was negative in ten years and positive in ten years. The highest revenue increase was 1,946.16% in the year 2012 and the lowest -90.07% in the year 2011 (Table 2).

Table 3, displays the relation of exported value and export reference price, as it can be seen, the export volume, was highest in the year 2012 with 1,017.9 t. (the only case when exported volume overcame 1,000 t) and the lowest occurred in the year 2000 with only 59.0 t, but the exported quantity of the product was very irregular through the years. In relation to the export reference price was highest during 2012 with 6,153.3 US\$/t and lowest during 2006 with only 580.3 US\$/t. Also, the export reference price was very irregular over the years.

### **Sorghum**

The price elasticity of demand for planting seeds of sorghum was elastic for six years, inelastic in three years, and unit one in four years. These results showed an irregular trend of elasticity, although it was mostly elastic. The highest elasticity was got in the year 2000 with only 3.54 and the lowest in the year 2012 with 0.44. The elasticity cannot be estimated in seven years due to there was no export volume in these years. On the other hand, there were five years where the

elástica. La Cuadro 2 también muestra el aumento de ingresos, el cual fue negativo en 11 años y positivo en cinco años. El mayor aumento de ingresos se obtuvo en el año 2009 (711,69%) y el menor en los años 2002 y 2005 (-100,00%).

En la Cuadro 2, se muestra la relación del valor exportado y el precio referencial de exportación, donde se puede apreciar que el volumen exportado fue muy variable. La mayor cantidad exportada se alcanzó en el año 2010 (218,1 t) y la menor en el año 2003 (5,1 t). En relación al precio referencial de exportación, fue más alto en el año 2017 (5.714,0 US \$ / t) y el más bajo en el año 2004 (258,3 US \$ / t). Además, el precio de referencia de exportación fue muy variable. Las exportaciones no se realizaron en los años 2002 y 2005 a 2007, pero desde 2008, las exportaciones fueron constantes y desde el año 2013 el precio de referencia de exportación fue superior a 3.000 US \$ / t.

Las semillas de maíz para cultivo (excepto las semillas de maíz amarillo y dulce) tuvieron una demanda fluctuante, ya que varió de 0,07 (el año 2004) a 54,93 (el año 2001). Se presentan ocho demandas inelásticas y 12 demandas elásticas. Esto significa que no hubo una tendencia en la elasticidad, incluso dos demandas inelásticas estuvieron por encima de 1,0 solo para 0,07. En relación al aumento de los ingresos, fue negativo en diez años y positivo en diez años. El mayor aumento de ingresos fue de 1.946,16% en el año 2012 y el más bajo -90,07% en el año 2011 (Cuadro 2).

revenue increase was negative and six years where revenue increase was positive. The highest revenue increase was obtained in the year 2011 with 1,251.80% and the lowest in the years 1999 and 2002 with -100.00%.

Table 4 shows the relation of exported value and export reference price, as it can be seen the export reference price was highest in the year 2010 (7,169.6 US\$/t) and lowest in the year 2016 (429. 5 US\$/t). In relation to exported volume, it was highest in the year 2015 (263.1 t) and lowest in the year 2018 (0.4 t), also the exported volume was under 1 t in year 2010 (0.9 t).

En la Cuadro 3, se muestra la relación de valor exportado y precio de referencia de exportación para otros maíces (excepto maíz amarillo y dulce). Como se puede apreciar, el volumen de exportación, fue mayor en el año 2012 con 1.017,9 t, el único caso en el que el volumen exportado superó las 1.000 t y el menor ocurrió en el año 2000 con sólo 59.0 t, pero la cantidad exportada del producto fue muy irregular a lo largo de los años. En relación a la exportación, el precio de referencia fue más alto durante 2012 con 6.153,3 US \$ / t y más bajo durante 2006 con solo 580,3 US \$ / t. Además, el precio de referencia de

**Table 3. Price elasticity of the demand, revenue increase and other economic variables of planting seeds of corn (except yellow and sweet corns) from Mexico to the United States of America.**

**Cuadro 3. Elasticidad precio de la demanda, aumento de los ingresos y otras variables económicas de las semillas de maíz para cultivo (excepto maíz amarillo y dulce) desde México hacia los Estados Unidos de América.**

Variable †	Years 1999-2008									
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
ERP(US\$/t)	1,360.1	1,267.4	1,263.8	812.2	834.2	587.2	796.2	580.3	1,313.3	1,992.9
EV (t)	430.4	59.0	69.0	156.9	101.4	99.0	71.1	177.8	223.4	322.4
PED	2.09	21.51	54.93	1.79	16.08	0.07	1.09	2.73	0.29	0.88
RI (%)	54.25	-87.23	16.62	46.14	-33.62	-31.28	-2.62	82.26	184.36	118.99
Variable †	Years 2009-2018									
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
ERP(US\$/t)	3,122.9	4,734.8	4,222.1	6,153.2	5,767.1	2,439.8	1,452.2	753.2	1,030.3	1,869.8
EV (t)	446.4	650.8	72.5	1,017.9	403.2	846.5	497.0	675.6	808.8	253.1
PED	0.73	0.91	13.97	4.66	13.35	0.87	1.03	0.48	0.58	1.81
RI (%)	116.97	121.04	-90.07	1,946.16	-62.87	-11.18	-65.05	-29.50	63.76	-43.21

†ERP: Export reference price; EV: Exported volume; PED: Price elasticity of the demand and RI: Revenue increase. Source of ERP and EV data: FAS (2019).

†ERP: Precio de Exportación de Referencia; EV: Volumen Exportado; PED: Elasticidad precio de la Demanda y RI: Incremento de los Ingresos. Fuente de datos de ERP y EV: FAS (2019).



**Table 4. Price elasticity of the demand, revenue increase and other economic variables of planting seeds of sorghum exported from Mexico to the United States of America.**

**Cuadro 4. Elasticidad precio de la demanda, aumento de ingresos y otras variables económicas de las semillas del cultivo de sorgo exportadas de México a Estados Unidos de América.**

Years 1999-2008										
Variable †	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
ERP(US\$/t)		1,000.0	600.1							
EV (t)		3.0	48.5							
<b>PED</b>	<b>1.00</b>	<b>1.00</b>	<b>3.54</b>	<b>1.00</b>						
<b>RI (%)</b>	<b>-100.00</b>		<b>870.16</b>	<b>-100.00</b>						

Years 2009-2018										
Variable †	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
ERP(US\$/t)		7,169.6	1,713.8	2,103.2	1,200.9	1,701.2	1,158.3	429.5	927.9	5,667.5
EV (t)		0.9	50.9	55.7	93.5	70.9	263.1	46.7	144.6	0.4
<b>PED</b>		<b>1.00</b>	<b>1.57</b>	<b>0.44</b>	<b>0.93</b>	<b>0.80</b>	<b>3.03</b>	<b>1.52</b>	<b>1.39</b>	<b>1.38</b>
<b>RI (%)</b>			<b>1,251.89</b>	<b>34.29</b>	<b>-4.15</b>	<b>7.42</b>	<b>152.66</b>	<b>-93.42</b>	<b>568.94</b>	<b>-98.31</b>

†ERP: Export reference price; EV: Exported volume; PED: Price elasticity of the demand and RI: Revenue increase. Source of ERP and EV data: FAS (2019).

†ERP: Precio de Exportación de Referencia; EV: Volumen Exportado; PED: Elasticidad precio de la Demanda y RI: Incremento de los Ingresos. Fuente de datos de ERP y EV: FAS (2019).

**Chickpea**

The price elasticity of demand of planting seeds of chickpea varied from 1.00 to 83.24, demand was relatively elastic in 17 years, and never was relatively inelastic in the 20 years and it was unity elasticity in two years (2012 and 2014) with the particularity that there was not exported volume in 2012 and 2013 (Table 4). It can be said that the price elasticity of demand was elastic.

Table 5 displays the revenue increase; it was negative in eight years and positive in ten years. The highest revenue increase was attained in the year 2015 (3,826.69%) and the lowest in the year 2012 (-100.00%). Table 5 also shows the relation of exported value and

exportación fue muy irregular a lo largo de los años.

**Sorgo**

La elasticidad precio de la demanda para semillas de cultivo de sorgo fue elástica durante seis años, inelástica en tres años y unidad uno en cuatro años. Estos resultados mostraron una tendencia irregular de la elasticidad, aunque mayoritariamente elástica. La elasticidad más alta se obtuvo en el año 2000 con solo 3,54 y la más baja en el año 2012 con 0,44. La elasticidad no se puede estimar en siete años debido a que no hubo volumen de exportación en estos años. Por otro lado, hubo cinco años en los que el aumento de ingresos fue negativo y seis años en los que

export reference price, as it can be noted the exported volume was variable. The highest exported quantity was got in the year 2007 (253.6t) and the lowest in the year 2011 (1.5 t), also, the exported volume was low in 2014 (3.9 t). In the relation to the export reference price, it was highest in the year 2011 (2,283.7 US\$/t) and lowest in the year 2003 (604.2 US\$/t). Also, the export reference price was variable. The exports were not done in the years 2012 and 2013.

el aumento de ingresos fue positivo. El mayor incremento de ingresos se obtuvo en el año 2011 con 1.251,80% y el menor en los años 1999 y 2002 con -100,00%.

En la Cuadro 4, se muestra la relación del valor exportado con el precio de referencia de exportación, como se puede observar, el precio de referencia de exportación fue más alto en el año 2010 (7.169,6 US \$ / t) y más bajo en el año 2016 (429,5

**Table 5. Price elasticity of the demand, revenue increase and other economic variables of planting seeds of chickpea exported from Mexico to the United States of America.**

**Cuadro 5. Elasticidad precio de la demanda, incremento de ingresos y otras variables económicas de la siembra de semillas de garbanzo exportadas de México a Estados Unidos de América.**

Variable †	Years 1999-2008									
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
ERP(US\$/t)	699.5	708.0	660.7	662.7	604.2	848.3	994.4	822.3	747.3	808.9
EV (t)	145.6	172.2	149.9	116.4	141.8	39.9	87.8	152.0	253.6	208.0
<b>PED</b>	<b>3.15</b>	<b>13.86</b>	<b>2.00</b>	<b>83.24</b>	<b>2.13</b>	<b>3.34</b>	<b>4.73</b>	<b>2.83</b>	<b>5.24</b>	<b>2.50</b>
<b>RI (%)</b>	<b>12.72</b>	<b>19.71</b>	<b>-18.77</b>	<b>-22.11</b>	<b>11.07</b>	<b>-60.49</b>	<b>157.95</b>	<b>43.16</b>	<b>51.62</b>	<b>-11.22</b>
Variable †	Years 2009-2018									
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
ERP(US\$/t)	900.0	1,044.4	2,283.7			1,188.2	1,838.0	1,763.6	1,948.8	1,481.9
EV (t)	87.8	118.9	1.5			3.9	99.0	135.3	236.7	131.1
<b>PED</b>	<b>7.62</b>	<b>2.03</b>	<b>2.62</b>	<b>1.00</b>		<b>1.00</b>	<b>4.30</b>	<b>7.50</b>	<b>5.46</b>	<b>2.11</b>
<b>RI (%)</b>	<b>-53.03</b>	<b>57.15</b>	<b>-97.24</b>	<b>-100.00</b>				<b>3,826.69</b>	<b>31.13</b>	<b>-57.88</b>

†ERP: Export reference price; EV: Exported volume; PED: Price elasticity of the demand and RI: Revenue increase. Source of ERP and EV data: FAS (2019).

†ERP: Precio de Exportación de Referencia; EV: Volumen Exportado; PED: Elasticidad precio de la Demanda y RI: Incremento de los Ingresos. Fuente de datos de ERP y EV: FAS (2019).

## Pumpkin

Planting seeds of pumpkin had a shifting demand, since it varied from 0.15 (the year 2007) to 12.65 (the year 2003). There were seven inelastic demands and 13 elastic demands.

US \$ / t) . En relación al volumen exportado, fue mayor en el año 2015 (263.1 t) y menor en el año 2018 (0.4 t), además el volumen exportado estuvo por debajo de 1 t en el año 2010 (0.9 t).

This means that demand was mostly elastic. In relation to revenue increase, it was negative in 11 years and positive in nine years. The highest revenue increases were 318.38% in the year 2011 and the lowest -84.94% in the year 2002 (Table 6).

**Garbanzo**

La elasticidad precio de la demanda de las semillas de garbanzo varió de 1,00 a 83,24, la demanda fue relativamente elástica en 17 años, y nunca fue relativamente inelástica en los 20 años y fue elasticidad

**Table 6. Price elasticity of the demand, revenue increase and other economic variables of planting seeds of pumpkin exported from Mexico to the United States of America.**

**Cuadro 6. Elasticidad precio de la demanda, aumento de ingresos y otras variables económicas de la siembra de semillas de calabaza exportadas de México a Estados Unidos de América.**

Variable †	Years 1999-2008									
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
ERP(US\$/t)	3,243.8	3,468.1	2,210.5	1,173.8	1,097.8	1,210.0	1,101.9	1,288.9	2,801.0	6,516.2
EV (t)	588.6	440.7	153.7	43.6	107.6	94.8	103.5	106.4	95.4	124.4
<b>PED</b>	<b>2.26</b>	<b>4.30</b>	<b>2.18</b>	<b>1.82</b>	<b>12.65</b>	<b>1.30</b>	<b>0.94</b>	<b>0.18</b>	<b>0.15</b>	<b>0.33</b>
<b>RI (%)</b>	<b>10.19</b>	<b>-19.95</b>	<b>-77.77</b>	<b>-84.94</b>	<b>130.81</b>	<b>-2.89</b>	<b>-0.58</b>	<b>20.25</b>	<b>94.85</b>	<b>203.36</b>
Variable †	Years 2009-2018									
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
ERP(US\$/t)	3,813.7	5,095.3	6,736.8	6,233.1	3,513.9	4,487.7	4,135.3	3,820.6	4,315.8	3,190.1
EV (t)	147.4	116.8	369.6	126.4	115.0	81.1	106.6	61.7	81.0	59.2
<b>PED</b>	<b>0.32</b>	<b>0.81</b>	<b>3.75</b>	<b>12.63</b>	<b>0.17</b>	<b>1.42</b>	<b>3.32</b>	<b>6.74</b>	<b>2.22</b>	<b>1.04</b>
<b>RI (%)</b>	<b>-30.65</b>	<b>5.87</b>	<b>318.38</b>	<b>-68.36</b>	<b>-48.71</b>	<b>-9.93</b>	<b>21.12</b>	<b>-46.52</b>	<b>48.30</b>	<b>-45.98</b>

†ERP: Export reference price; EV: Exported volume; PED: Price elasticity of the demand and RI: Revenue increase. Source of ERP and EV data: FAS (2019).

†ERP: Precio de Exportación de Referencia; EV: Volumen Exportado; PED: Elesticidad precio de la Demanda y RI: Incremento de los Ingresos. Fuente de datos de ERP y EV: FAS (2019).

Table 6, shows the relation of exported value and export reference price, as it can be observed, the export volume was highest in the year 1999 with 588.6 t (the only case when exported volume overcame 500 t) and the lowest occurred in the year 2002 with only 43.6 t, but the exported quantity of the product was very irregular through the years. In relation to the export reference

unitaria en dos años (2012 y 2014), con la particularidad de que no hubo volumen exportado en 2012 y 2013 (Cuadro 4). Se puede afirmar que la elasticidad precio de la demanda fue elástica.

En el Cuadro 5 muestra el aumento de los ingresos; el cual fue negativo en ocho años y positivo en diez años. El mayor incremento de ingresos se alcanzó en el año 2015 (3.826,69%) y

**Table 7. Price elasticity of the demand, revenue increase and other economic variables of planting seeds of cucumber exported from Mexico to the United States of America.**

**Cuadro 7. Elasticidad precio de la demanda, incremento de ingresos y otras variables económicas de la semillas de pepino exportadas de México a Estados Unidos de América.**

Variable †	Years 1999-2008									
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
ERP(US\$/t)	293,981.0	223,625.9	147,822.1	200,975.2	207,910.9	194,363.2	169,929.0	159,266.2	171,352.4	82,495.6
EV (t)	1.9	5.0	3.2	4.5	2.7	3.1	2.6	1.7	1.4	6.5
<b>PED</b>	<b>1.21</b>	<b>3.31</b>	<b>1.08</b>	<b>1.11</b>	<b>14.74</b>	<b>2.05</b>	<b>1.31</b>	<b>6.46</b>	<b>2.65</b>	<b>1.84</b>
<b>RI (%)</b>	<b>-41.13</b>	<b>100.18</b>	<b>-57.69</b>	<b>91.19</b>	<b>-37.93</b>	<b>7.33</b>	<b>-26.67</b>	<b>-38.72</b>	<b>-11.40</b>	<b>123.52</b>
Variable †	Years 2009-2018									
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
ERP(US\$/t)	364,664.2	163,351.5	34,7931.1	394,969.8	412,070.5	209,680.5	328,395.9	692,252.4	622,603.5	217,388.5
EV (t)	2.5	5.8	3.5	11.5	8.3	5.0	0.6	0.1	0.2	1.2
<b>PED</b>	<b>0.70</b>	<b>1.04</b>	<b>0.69</b>	<b>8.42</b>	<b>7.63</b>	<b>0.76</b>	<b>3.56</b>	<b>2.00</b>	<b>6.29</b>	<b>1.48</b>
<b>RI (%)</b>	<b>70.02</b>	<b>3.92</b>	<b>28.53</b>	<b>272.99</b>	<b>-24.70</b>	<b>-69.35</b>	<b>-81.21</b>	<b>-64.87</b>	<b>79.88</b>	<b>109.45</b>

†ERP: Export reference price; EV: Exported volume; PED: Price elasticity of the demand and RI: Revenue increase. Source of ERP and EV data: FAS (2019).

†ERP: Precio de Exportación de Referencia; EV: Volumen Exportado; PED: Elasticidad precio de la Demanda y RI: Incremento de los Ingresos. Fuente de datos de ERP y EV: FAS (2019).

price was highest during 2011 with 6,736.8 US\$/t and lowest during 2003 with only 1,097.8 US\$/t. Also, the export reference price was very irregular through the years but never diminished under 1,000 US\$/t.

### Cucumber

The price elasticity of demand for planting seeds of cucumber was elastic for 17 years and inelastic in three years. These results showed that the elasticity was mostly elastic. The highest elasticity was got in the year 2003 with 14.74 and the lowest in the year 2011 with 0.69. In the other hand, there were ten years when the revenue increase was negative and ten years when revenue increase was positive. The highest revenue increase was obtained in the year 2012 with 272.99% and the lowest in the year 2015 with -81.21% (Table 7).

Table 7 displays the relation of exported value and export reference price, as it can be noted the export reference price was highest in the year 2016 (692,252.40 US\$/t) and lowest in the year 1998 (66,815.6 US\$/t). In relation to exported volume, it was highest in the year 1998 (14.2 t) and lowest in the year 2016 (barely 0.1 t), also, the exported volumes were under 1.0 t in 2015 and 2017 with 0.6 and 0.2t, respectively.

The Pearson's correlation coefficients are shown in Table 8 for: 1) Elastic behavior, which is shown in the upper line and is referred to: a) Export reference price and Exported volume (left-hand), and b) Export reference price and income (right-hand); 2) Inelastic behavior, which is shown in the bottom line, and is referred to: a) Export reference price and exported

el menor en el año 2012 (-100,00%). En el Cuadro 5 también se muestra la relación del valor exportado y el precio de referencia de exportación, ya que se puede observar que el volumen exportado fue variable. La mayor cantidad exportada se obtuvo en el año 2007 (253,6t) y la menor en el año 2011 (1.5 t), además, el volumen exportado fue bajo en 2014 (3,9 t). En relación al precio de referencia de exportación, fue más alto en el año 2011 (2.283,7 US \$ / t) y más bajo en el año 2003 (604,2 US \$ / t). Además, el precio de referencia de exportación fue variable. Las exportaciones no se realizaron en los años 2012 y 2013.

### Calabaza

La semilla para siembra de calabaza tuvo una demanda cambiante, ya que varió de 0,15 (el año 2007) a 12,65 (el año 2003). Hubo siete demandas inelásticas y 13 demandas elásticas. Esto significa que la demanda fue mayoritariamente elástica. En relación al aumento de ingresos, fue negativo en 11 años y positivo en nueve años. Los mayores aumentos de ingresos fueron 318,38% en el año 2011 y los más bajos -84,94% en el año 2002 (Cuadro 6).

En la Cuadro 6, también se muestra el valor exportado y el precio de referencia de exportación. Como se puede observar, el volumen de exportación fue mayor en el año 1999 con 588.6 t (el único caso cuando el volumen exportado superó las 500 t) y el menor ocurrió en el año 2002 con solo 43,6 t, pero la cantidad exportada del producto fue muy irregular a lo largo de los años. En relación con la exportación, el precio de referencia

volume (left-hand), and b) Export reference Price and income (right-hand). Both correlations correspond to all six Mexican seeds.

When the elasticity was elastic, the correlation between the ERP and EV was non significant ( $p > 0.05$ ), for yellow corn, sorghum, chickpea, and cucumber. The same behavior is observed in the correlation between ERP and Income. For pumpkin this only applies to the Export volume. However, regarding the other corn seeds, the correlation was positive and significant ( $p \leq 0.05$ ), and highly significant ( $p \leq 0.01$ ) for EV and Income, respectively. This means that, when the ERP increases (decreases) the Income also increases (decreases), showing a directly proportional relation. These results suggest that, in this particular case, as the ERP increases Mexican exporters obtain more incomes from corn seed exportation, which is entirely profitable.

On the other hand, for pumpkin, the correlation between the ERP and Incomes was positive and significant ( $p \leq 0.05$ ). This is because an increase (decrease) in the ERP results also in an increase (decrease) of incomes, with a directly proportional relation.

For four seeds (yellow corn, sorghum, chickpea, and cucumber), a non-significant correlation ( $p \leq 0.05$ ) was found. This indicates that when the ERP increases or decreases there is no defined trend with respect to the EV and Income.

When elasticity is inelastic, it is observed that there is no correlation ( $p > 0.05$ ) for sorghum, and cucumber, which means that there is no defined

fue más alto durante 2011 con 6.736,8 US \$ / t y más bajo durante 2003 con solo 1.097,8 US \$ / t. Además, el precio de referencia de exportación fue muy irregular a lo largo de los años, pero nunca disminuyó por debajo de los 1.000 US \$ / t.

### **Pepino**

La elasticidad precio de la demanda de semillas de pepino fue elástica durante 17 años e inelástica en tres años. Estos resultados mostraron que la elasticidad era principalmente elástica. La mayor elasticidad se obtuvo en el año 2003 con 14,74 y la menor en el año 2011 con 0,69. Por otro lado, hubo diez años en los que el aumento de los ingresos fue negativo y diez años en los que el aumento de los ingresos fue positivo. El mayor incremento de ingresos se obtuvo en el año 2012 con 272,99% y el menor en el año 2015 con -81,21% (Cuadro 7).

En la Cuadro 7 se muestra la evolución histórica del valor exportado y del precio de referencia de exportación, como se puede observar, el precio de referencia de exportación fue más alto en el año 2016 (692,252.40 US \$ / t) y más bajo en el año 1998 (66,815.6 US \$ / t). En relación al volumen exportado, fue mayor en el año 1998 (14.2 t) y menor en el año 2016 (apenas 0.1 t), además, los volúmenes exportados estuvieron por debajo de 1.0 t en 2015 y 2017 con 0.6 y 0.2t, respectivamente.

La Cuadro 8, muestra los coeficientes de correlación de Pearson para: 1) Comportamiento elástico, el cual se muestra en la parte superior y alude a lo siguiente: a) Precio de exportación de referencia y Volumen

trend between the ERP and Income. In the case of all corn seeds, and pumpkin, this observation only applies to the relation between the ERP and Income, which showed a positive and highly significant correlation ( $p \leq 0.01$ ), showing a directly proportional relation. For sorghum, the correlation of ERP was positive and significant ( $p \leq 0.05$ ), with respect to the EV. For chickpea, it was not possible to estimate de correlation coefficient for inelastic demand. This is because all other elasticities were inelastic. This suggests that, for these seeds exportations increase, resulting in a profitable situation for exporters.

The price elasticity of demand was mostly elastic for yellow corn (55.6%), other corns, except yellow and sweet corns (60.0%), chickpea (89.5%), pumpkin (65.0%) and cucumber (85.0%) and was low in sorghum (46.2%). Demand is elastic if the increase in the price reduces importer spending and if reducing it increases importer spending, demand is inelastic if increasing the price increases importer spending and if reducing it reduces spending of the importer and demand is unitary, when the price increases or decreases, importer spending remains constant.

In summary, the demand is elastic if the price varies, importer spending varies in the opposite direction; it is inelastic if, when the price varies, the cost of the importer varies in the same direction. In the inelastic demand, if the price is increased, demand remains stable, in contrast, in elastic demand; the price increases will cause many importers to stop purchasing the planting seeds as it is the case of all six planting seeds except sorghum.

exportado (izquierda) así como b) Precio de exportación de referencia e ingresos (Derecha). También se muestra: 2) Comportamiento inelástico, el cual se muestra en la parte inferior y alude a lo siguiente a) Precio de exportación de referencia y Volumen exportado (izquierda) y b) Precio de exportación de referencia e ingresos (Derecha). Las dos correlaciones son referidas a las seis semillas de cultivo mexicanas.

Cuando la elasticidad fue elástica, se puede observar que hubo una correlación no significativa ( $p > 0,05$ ) entre Precio de exportación de referencia y Volumen exportado, así como Precio de exportación de referencia e ingresos, para maíz amarillo, sorgo, garbanzo y pepino. En el caso de Calabaza solo aplica para el Volumen exportado. Sin embargo, la correlación para otros maíces fue positiva y significativa ( $p \leq 0,05$ ) y altamente significativa ( $p \leq 0,01$ ) para Volumen exportado e Ingresos, respectivamente. Esto significa que cuando el Precio de exportación de referencia aumenta o disminuye, también aumenta o disminuye el ingreso, siendo estos directamente proporcionales. Estos resultados sugieren que, para este caso en particular, cuando aumenta el precio de referencia de exportación, los exportadores mexicanos venden más semillas de maíz y obtienen más ingresos, situación muy rentable para ellos y viceversa.

Por otro lado, la correlación para calabaza fue positiva significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre el Precio de exportación de referencia con relación al ingreso.

**Table 8. Pearson's correlation coefficients (r) between export reference price (ERP) with exported volume (EV) and income of six Mexican planting seeds exported to United States of America from Mexico in the period 1998-2018 when elasticity was elastic (above) and when elasticity was inelastic (below).**

**Cuadro 8. Coeficientes de correlación de Pearson (r) del precio de referencia de exportación (ERP) con el volumen exportado (EV) y el ingreso de seis semillas para las siembras mexicanas exportadas a Estados Unidos de América desde México, en el período 1998-2018 cuando la elasticidad era elástica (arriba) y cuando la elasticidad era inelástica (abajo).**

	Yellow corn	Other corn †	Sorghum	Chickpea	Pumpkin	Cucumber
Yellow corn	-0.352 & 0.115 0.775 & 0.999 **					
Other corn		0.693 * & 0.808 ** 0.272 & 0.913 **				
Sorghum			-0.414 & -0.309 -0.999 * & 0.631			
Chickpea				-0.272 & 0.394 NE		
Pumpkin					0.229 & 0.573* 0.513 & 0.980**	
Cucumber						-0.161 & 0.154 -0.952 & -0037

\*\* Altamente significativo ( $p \leq 0.01$ ). \* Significativo ( $p \leq 0.05$ ). Los datos reportados sin (\*, \*\*) son no significativos ( $p > 0.05$ ). † Los primeros valores son entre ERP y EV, mientras que los segundos entre ERP y las ganancias.

*Nota:* NE: No Estimado. El número de observaciones fueron 10, 12, 6, 17, 13 y 17 para el maíz Amarillo, otros tipos de maíz (except amarillo y dulce), sorgo, garbanzo, calabaza y pepino, respectivamente, para elasticidad elástica, y 4, 8, 3, 0, 7 y 3, respectivamente, para elasticidad inelástica. El ingreso fue estimado como  $I = ERP \times EV$ .

\*\* Highly significant ( $p \leq 0.01$ ). \* Significant ( $p \leq 0.05$ ). r's without \*\* and \* are not significant ( $p > 0.05$ ). † First r's are between ERP and EV and second r's are between ERP and income.

*Note:* NE: No estimated. Number of observations were 10, 12, 6, 17, 13 and 17 for yellow corn, other cons (except yellow and sweet corn), sorghum, chickpea, pumpkin and cucumber, respectively) when elasticity was elastic and 4, 8, 3, 0, 7 and 3 when elasticity was inelastic. Income was calculated as:  $I = ERP \times EV$



The price elasticity of demand is a measure of how much the quantity demanded of planting seeds varies with variations in its price. The price elasticity of demand is the percentage of change in the quantity demanded given a percentage of change in the price. As it was mentioned before, the value of elasticity allows planting seeds to be classified according to their sensitivity to price variations. Three types of demand were distinguished according to this value: elastic demand that is the variation in the quantity demanded is a percentage higher than the price. Inelastic demand is the variation of the quantity demanded is a percentage lower than that of the price and unitary elasticity demand that is the variation of the quantity demanded is percentage equal to that of the price.

Another very important aspect is that referring to substitute products, since if there are numerous substitutes, the demand for the planting seeds will be elastic (yellow corn, other corns (except yellow and sweet corns, chickpea, pumpkin, and cucumber) and its consumption can be replaced. In the opposite case, with few substitutes, the demand will tend to be inelastic (sorghum); however, it is not possible to establish the causality of the results obtained in this investigation.

Similar results were reported by Vukadinović *et al.* (2017) who stated that the analysis of the demand elasticity coefficients shows that elasticity of demand is more dominant in comparison to the inelasticity. However, if one takes into account

Esto significa que cuando el Precio de exportación de referencia aumenta o disminuye, también aumenta o disminuye el ingreso, siendo directamente proporcionales.

Para las otras cuatro semillas (maíz amarillo, Sorgo, Garbanzo y Pepino), no se encontró correlación significativa ( $p \leq 0.05$ ), indicando que cuando el Precio de exportación de referencia aumenta o disminuye no se observa una tendencia definida con relación a Volumen exportado e Ingresos.

Table 8. Pearson's correlation coefficients ( $r$ ) between export reference price (ERP) with exported volume (EV) and income of six Mexican planting seeds exported to United States of America from Mexico in the period 1998-2018 when elasticity was elastic (above) and when elasticity was inelastic (below).

Cuadro 8. Coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) del precio de referencia de exportación (ERP) con el volumen exportado (EV) y el ingreso de seis semillas para las siembras mexicanas exportadas a Estados Unidos de América desde México, en el período 1998-2018 cuando la elasticidad era elástica (arriba) y cuando la elasticidad era inelástica (abajo).

Cuando la elasticidad fue inelástica, se pudo observar que no hubo una Correlación significativa ( $p > 0,05$ ), para Sorgo, y Pepino, esto significa que cuando el Precio de exportación de referencia aumenta o disminuye no se observa una tendencia definida con relación al Ingreso. En el caso de Maíz amarillo, otros Maíces, y Calabaza solo

the indifference of the elasticity of demand, then the situation changes and it becomes evident that the elasticity of demand does not dominate the planting seed of sorghum to less extent for yellow corn.

The largest numbers of indifferent positions in the categories of planting seeds were observed for sorghum and yellow corn. This situation reflects the fact that in these planting seeds there is the largest number of positions in which demand is not dependent on changes in prices and that the indifference was affected by other factors of demand that are of non-price character. The highest elasticity coefficient calculated in the planting seed crops was 83.24 for chickpea, which means that in 2002, 1% of changes in prices parked 83.24% of changes in the quantity demanded of chickpea planting seeds. The minimum coefficient of elasticity was calculated in other corn (except yellow and sweet corn) and it was 1.03, which means that in 2015, 1% of price changes caused 1.03% of changes in the quantity demanded of other corn planting seeds. This coefficient almost brings closer the elasticity of demand to unit elasticity.

The highest coefficient of inelasticity calculated in yellow corn and pumpkin planting seeds was 0.94, which means that price changes 1% in 2004 and 2005, respectively caused a change in the quantity demanded of products by 0.94%. The lowest coefficient of inelasticity was calculated in yellow corn and other corns (except yellow corn and sweet corn) and was 0.07, which means

aplica para el Precio de exportación de referencia e Ingresos y esta fue positiva y altamente significativa ( $p \leq 0,01$ ), esto significa que cuando el Precio de exportación de referencia aumenta o disminuye, también aumenta o disminuye el ingreso, siendo directamente proporcionales. Para el caso de Sorgo la Correlación fue positiva y significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre el Precio de exportación de referencia y Volumen exportado.

Para el garbanzo no fue posible calcular el coeficiente de correlación cuando la demanda era inelástica porque todas las elasticidades eran elásticas.

Estos resultados sugieren que, para maíz amarillo, otros maíces y semillas de calabaza, cuando el precio de referencia de exportación aumenta, los exportadores mexicanos venden más de estas semillas de siembra y exportan más productos, de nuevo es una situación muy rentable para ellos.

La elasticidad precio de la demanda fue mayoritariamente elástica para maíz amarillo (55,6%), otros maíces, excepto maíz amarillo y dulce (60,0%), garbanzo (89,5%), calabaza (65,0%) y pepino (85,0%) y fue baja en sorgo (46,2%). La demanda es elástica si el aumento del precio reduce el gasto del importador y si al reducirlo aumenta el gasto del importador, la demanda es inelástica si el aumento del precio aumenta el gasto del importador y si la reducción reduce el gasto del importador y la demanda es unitaria, cuando el precio aumenta o disminuye, el gasto de los importadores se mantiene constante.

that 1% of the change in 2017 and 2004, respectively, in prices of these planting seeds caused only 0.007% of the product quantities changes. This coefficient brings closer the elasticity of demand in these products to the perfectly inelastic demand.

## Conclusions

The results presented in this research allow us to conclude that 5 from 6 planting seeds showed a PED relatively elastic during most part of the years under investigation. Theoretically, this implies that the effect of the exported quantity was predominant with respect to the effect of the price. According to this, we would expect that during those years the incomes raise when prices lowered; on the contrary, the behavior of incomes showed positive and negative values, with no defined trends. For the sixth seed (sorghum), the demand was elastic in some cases and inelastic in many others. The behavior of incomes also showed an undefined trend for each of these cases.

The presence of no trends is complementary with the values of Pearson correlations: these show no significant levels between prices and incomes for each PED. For practical implications of these findings, the impact of PED on the incomes cannot be predicted with accuracy. Finally, our results depart from the classical theory of PED, since there is no defined trend in the incomes, with respect to variations in price for each detected elasticity. More work is required to investigate the causality of these results.

En resumen, la demanda es elástica si el precio varía, el gasto de los importadores varía en la dirección opuesta; es inelástica si, cuando varía el precio, el costo del importador varía en la misma dirección. En la demanda inelástica, si se incrementa el precio, la demanda permanece estable, en contraste, en la demanda elástica; los aumentos de precios harán que muchos importadores dejen de comprar las semillas de siembra como es el caso de las seis semillas de cultivo excepto el sorgo.

La elasticidad precio de la demanda es una medida de cuánto varía la cantidad demandada de semillas con las variaciones de su precio. La elasticidad precio de la demanda es el porcentaje de cambio en la cantidad demandada dado un porcentaje de cambio en el precio. Como se mencionó anteriormente, el valor de la elasticidad permite clasificar las semillas de cultivo según su sensibilidad a las variaciones de precio. Se distinguieron tres tipos de demanda según este valor: demanda elástica que es la variación en la cantidad demandada es un porcentaje superior al precio. La demanda inelástica es la variación de la cantidad demandada es un porcentaje menor que la del precio y la demanda de elasticidad unitaria es la variación de la cantidad demandada es un porcentaje igual a la del precio.

Otro aspecto muy importante es el referido a los productos sustitutos, ya que, si existen numerosos sustitutos, la demanda de las semillas de siembra será elástica (maíz amarillo, otros maíces excepto maíz amarillo

## Acknowledgement

The authors thank the University of Guanajuato for promoting scientific research as a strategic pillar to strengthen teaching.

### End of English Version

dulce, garbanzo, calabaza y pepino) y su consumo. En el caso contrario, con pocos sustitutos, la demanda tenderá a ser inelástica (sorgo), sin embargo, no es posible establecer la causalidad de los resultados obtenidos en esta investigación.

Resultados similares fueron reportados por Vukadinović *et al.* (2017) quienes afirmaron que el análisis de los coeficientes de elasticidad de la demanda muestra que la elasticidad de la demanda es más dominante en comparación con la inelasticidad. Sin embargo, si se tiene en cuenta la indiferencia de la elasticidad de la demanda, entonces la situación cambia y se hace evidente que la elasticidad de la demanda no domina para la semilla de sorgo y en menor medida para el maíz amarillo.

Se observó el mayor número de posiciones indiferentes en las categorías de semillas de siembra para sorgo y maíz amarillo. Esta situación refleja el hecho de que para estas semillas existe el mayor número de posiciones en las que la demanda no depende de cambios en los precios y que la indiferencia se vio afectada por otros factores de demanda que son de carácter no atinentes al precio. El coeficiente de elasticidad más alto calculado para las semillas de cultivo

fue de 83,24 para el garbanzo, lo que significa que en 2002 el 1% de los cambios en los precios ocasionó el 83,24% de los cambios en la cantidad demandada de semillas de garbanzo para la siembra. El coeficiente mínimo de elasticidad se calculó en otros maíces (excepto maíz amarillo y dulce) y fue de 1.03, lo que significa que, en 2015, 1% de los cambios de precios ocasionaron 1.03% de cambios en la cantidad demandada de otras semillas de siembra de maíz. Este coeficiente casi acerca la elasticidad de la demanda a la elasticidad unitaria.

El mayor coeficiente de inelasticidad calculado en semillas de maíz amarillo y calabaza para la siembra fue de 0,94, lo que significa que los cambios de precio de 1% en 2004 y 2005, respectivamente, provocaron un cambio en la cantidad demandada de productos en 0,94%. El menor coeficiente de inelasticidad se calculó en maíz amarillo y otros maíces (excepto maíz amarillo y maíz dulce) y fue de 0,07, lo que significa que el 1% del cambio en 2017 y 2004, respectivamente, en los precios de estas semillas para siembra causó solo 0,007% de cambio en las cantidades de producto. Este coeficiente acerca la elasticidad de la demanda de estos productos a la demanda perfectamente inelástica.

## Conclusiones

Los resultados presentados en esta investigación permiten concluir que 5 de 6 semillas para siembra (maíz, otros maíces excepto maíz amarillo y dulce, garbanzo, calabaza y pepino)

mostraron una EPD relativamente elástica durante la mayor parte de los años bajo investigación. En teoría, esto implica que el efecto de las cantidades exportadas fue predominante con respecto al efecto del precio. De acuerdo con esto, se esperaría que, durante esos años, los ingresos suban cuando bajan los precios; por el contrario, el comportamiento de los ingresos mostró valores positivos y negativos, sin tendencias definidas. Para la sexta semilla (sorgo), la demanda fue elástica en algunos casos e inelástica en muchos otros. El comportamiento de los ingresos también mostró una tendencia indefinida para cada uno de estos casos.

La ausencia de tendencias es complementaria con los valores de las correlaciones de Pearson: estas no muestran niveles significativos entre precios e ingresos para cada EPD. Para las implicaciones prácticas de estos hallazgos, el impacto de la EPD en los ingresos no se puede predecir con precisión. Finalmente, nuestros resultados se apartan de la teoría clásica de la EPD, ya que no existe una tendencia definida en los ingresos, con respecto a las variaciones de precio para cada elasticidad detectada. Se requiere más trabajo para investigar la causalidad de estos resultados.

## Agradecimiento

Los autores agradecen a la Universidad de Guanajuato por impulsar la investigación científica como pilar estratégico para fortalecer la docencia.

## Literature cited

- Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. 2015. Las semillas en México. Reporte del CEDRSSAR. <https://cutt.ly/pnimDoD>
- De la Fuente Traverso, T. 2014. Una mirada a la industria semillera. <https://cutt.ly/TnimHHU>
- Foreign Agriculture Service. 2019. Global agriculture trade system online. United States Department of Agriculture. <https://cutt.ly/znimKPN>
- Herrera B., V. H. 2013. Análisis de la demanda de tabaco en Panamá y el control del efecto asequibilidad con medidas fiscales y control del contrabando: Implicaciones para Política Fiscal 2000-2011. <https://cutt.ly/wnimLBZ>
- Hernández Díaz, A. G. and E. C. García Cobián. 2014. Elasticidad precio de la demanda y perfil de los usuarios de la parada "Pablo de Olavide" de Metro de Sevilla. *Revista de Métodos Cuantitativos para la Economía y la Empresa*, (17): 80-100. <https://cutt.ly/OnimNVj>
- International Seed Federation. 2018a. Exports of seed for sowing by country – Calendar year 2017. <https://cutt.ly/Mnim1qk>
- International Seed Federation. 2018b. Imports of seed for sowing by country – Calendar year 2017. <https://cutt.ly/pnim0o2>
- Krugman, P. and R. Wells. 2006. *Introducción a la microeconomía*. Editorial Reverte.
- Licona Michel, A. and G. Correa López, 2020. Comercio y distribución de la inversión extranjera directa de Estados Unidos de América en los Estados Unidos Mexicanos. *Cimexus*, 15(1): 33-56. <https://cutt.ly/lngiKcN>
- Luna Mena, B. M., M. A. Hinojosa Rodríguez, O. J. Ayala Garay, F. Castillo González and A. Mejía Contreras. 2012. Perspectivas de desarrollo de

- la industria semillera de maíz en México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(1): 1-7. <https://cutt.ly/Enim271>
- MasterIT.ie. 2006. Arc elasticity calculator. Computer Consultancy, Website Development, Educational Software. <https://cutt.ly/fnim8Vh>
- Mastretta-Yanes, A., M. R. Bellon, F. Acevedo, C. Burgeff, D. Piñero and J. Sarukhán. 2019. Un programa para México de conservación y uso de la diversidad genética de las plantas domesticadas y sus parientes silvestres. *Rev. Fitotec. Mex.* 42(4): 321-334. <https://cutt.ly/lngiMQy>
- Miller, R. L. and R. E. Meiners. 1990. *Microeconomía*. McGraw-Hill. México.
- Mora Rivera, J., A. Zamudio Carrillo, H. Fuentes Castro. 2014. Volatilidad e interdependencia en los precios agrícolas a partir de un modelo GARCH multivariado. *Anal. Econ.* XXIX (72): 35-56. <https://cutt.ly/Inim7zi>
- Omni-Calculator. 2019. Price Elasticity of Demand Calculator. <https://cutt.ly/Nnim6aZ>
- Gobierno del Estado de Jalisco. 2015. Jalisco, líder en exportación de semillas con alta calidad genética. <https://cutt.ly/kniQqQ9>
- Samuelson, P. A., and W. D. Nordhaus. 2005. *Economía*. McGraw – Hill Interamericana.
- Suárez Lugo, N. 2017. Consumo de cigarrillos y elasticidad precio-demanda. *Horiz. sanitario (en línea)*. 16 (3): 163-174. <http://dx.doi.org/10.19136/hs.a16n3.1751>
- Vukadinović, P., A. Damnjanović and J. Krstić-Randić. 2017. The analysis of indifference and the price elasticity of demand between different categories of agricultural products. *Economics of Agriculture*, 64 (2): 671-685. <https://doi.org/10.5937/ekoPolj1702671V>