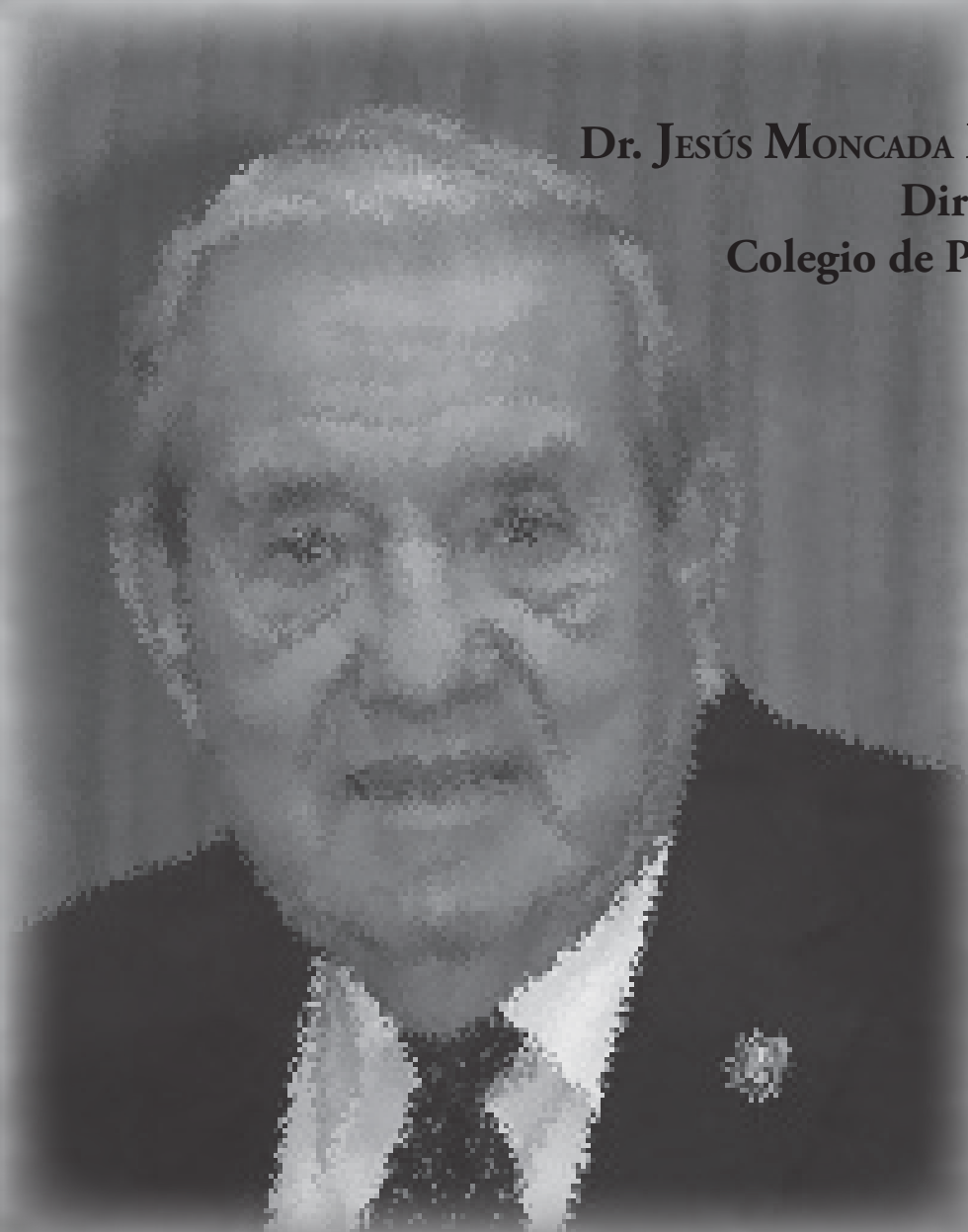


Agrociencia

Volumen 54, Número 6

16 de agosto - 30 de septiembre, 2020



Dr. JESÚS MONCADA DE LA FUENTE
Director General
Colegio de Postgraduados



SADER

SECRETARÍA DE AGRICULTURA
Y DESARROLLO RURAL

MÉXICO



DIRECTORIO

DIRECTOR DE AGROCIENCIA

Sergio S. González Muñoz

SUBDIRECTORA DE AGROCIENCIA

Ana Rita Román Jiménez

CONSEJO EDITORIAL INTERNACIONAL

Roger Austin (**Inglaterra**)

José Sarukhán Kermez (**México**)

Barry C. Arnold (**EUA**)

COMITÉ ASESOR EDITORIAL INTERNO

Jorge Alvarado López

Jorge D. Etchevers Barra

Víctor A. González Hernández

Leopoldo E. Mendoza Onofre

José A. Villaseñor Alva

RESPONSABLES DE LA EDICIÓN

Sergio S. González Muñoz

Ana Rita Román Jiménez

FORMACIÓN, DISEÑO Y MAQUETACIÓN

Brenda Espejel Lagunas

APOYO

Belem M. Villegas Contreras

Yolanda Feroso Meraz

DERECHOS DE AUTOR Y DERECHOS CONEXOS, **Volumen 54, número 6, 16 de agosto - 30 de septiembre, 2020**, Agrociencia es una publicación sesquimensual editada por el Colegio de Postgraduados. Carretera México- Texcoco, Km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. CP 56230. Tel. 5959284427. www.colpos.mx. Editor responsable: Dr. Sergio González Muñoz. Reservas de Derechos al Uso Exclusivo en trámite. ISSN: 2521-9766, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número, Dr. Sergio González Muñoz. Fecha de última modificación, **30 de septiembre de 2020**.

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación.

AGROCIENCIA está indizada en CURRENT CONTENTS®/AGRICULTURE, BIOLOGY & ENVIRONMENTAL SCIENCES® (CC/AB&ES), ISI ALERTING SERVICES®, el SCIENCE CITATION INDEX EXPANDED® (SCIE) y el JOURNAL CITATION REPORTS® del INSTITUTE FOR SCIENTIFIC INFORMATION (ISI), THE USDA-IBIDS ABSTRACTS, THE ESSENTIAL ELECTRONIC AGRICULTURAL LIBRARY (TEEAL), CURRENT INDEX TO STATISTICS, AGRICULTURE AND ENVIRONMENT FOR DEVELOPING REGIONS (TROPAG), AGRICULTURAL BIOLOGY, CAB ABSTRACTS, ZOOLOGICAL RECORD, PERIODICA, RED DE REVISTAS CIENTÍFICAS DE AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE (Red ALyC) y ScieELOMéxico; puede consultarse a través de AGRIS (FAO), AGRICOLA (EE. UU.), BIOSIS (HOLANDA) y DIRECTORY OF OPEN ACCESS JOURNALS (SUECIA).

AGROCIENCIA está incluida en el ÍNDICE DE REVISTAS MEXICANAS DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA del CONACYT.

Toda correspondencia (información de suscripciones, ventas, publicidad, contribuciones de autores, etc.) deberá dirigirse a:

Oficinas Centrales:

DIRECTOR DE AGROCIENCIA

Guerrero #9, Esquina Avenida Hidalgo.

56220. San Lus Huexotla. Texcoco, Estado de México

En el Colegio de Postgraduados

DIRECTOR DE AGROCIENCIA

Ganadería

Campus Montecillo

Colegio de Postgraduados

56230, Montecillo, Estado de México.

Apartado Postal 56

56230, Suc. Chapingo, Estado de México

Teléfono: 595 92 84427

agrociencia@colpos.mx

<http://www.colpos.mx/agrociencia/agrociencia.htm>

Aviso: Los nombres comerciales citados en los artículos, notas o ensayos, de ninguna manera implica patrocinio por parte de Agrociencia, ni crítica alguna a otros productos similares.

Portada: Jesús Moncada De la Fuente
Director General, CP



SADER

SECRETARÍA DE AGRICULTURA
Y DESARROLLO RURAL

CONTENIDO ❖ CONTENTS

Volumen 54

16 de agosto - 30 de septiembre, 2020

Número 6

Agua-Suelo-Clima ⇌ Water-Soil-Climate

DISEÑO DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICAR EMISIONES DE CO₂ (RESPIRACIÓN DEL SUELO) DURANTE INTERVALOS DIURNOS ⇌ CALIBRATION DESIGN TO QUANTIFY CO₂ EMISSIONS (SOIL RESPIRATION) DURING DAYTIME INTERVALS

Leticia Citlaly **López-Teloxa**, Alejandro Ismael **Monterroso-Rivas**, Jesús David **Gómez-Díaz** 731

Biotecnología ⇌ Biotechnology

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE INHIBIDORES DE PAPAÍNA PROVENIENTES DE SEMILLAS DE AMARANTO (*Amaranthus caudatus*) Y FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) ⇌ PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PAPAIN INHIBITORS FROM AMARANTO (*Amaranthus caudatus*) AND FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) SEEDS

Tannya Elizabeth **Ruiz-Tapia**, Gonzalo Rafael **Jácome-Camacho**, Marco Vinicio **Sinche-Serra**, Juan Patricio **Castillo-Domínguez**, Francesc Xavier **Avilés-Puigvert**, Martha **Hernández-de la Torre** 747

REGENERACIÓN *in vitro* DE PLANTAS DE *Tillandsia viridiflora* (Beer) Baker POR ORGANOGÉNESIS DIRECTA ⇌ *In vitro* PLANT REGENERATION OF *Tillandsia viridiflora* (Beer) Baker BY DIRECT ORGANOGENESIS

Jonathan **Márquez-Martínez**, María Cristina Guadalupe **López-Peralta**, Eleodoro **Hernández-Meneses**, Nicacio **Cruz-Huerta** 763

Fitociencia ⇌ Crop Science

CALIDAD POSCOSECHA DE 40 POBLACIONES DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) NATIVAS DE MÉXICO ⇌ POST-HARVEST QUALITY OF 40 COLLECTIONS OF TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.) NATIVE OF MEXICO

Ana María **Magallanes-López**, María Teresa **Martínez-Damián**, Jaime **Sahagún-Castellanos**, Laura Josefina **Pérez-Flores**, Iván Maryn **Marín-Montes**, Juan Enrique **Rodríguez-Pérez** 779

Protección Vegetal ⇌ Plant Protection

ESTADO NUTRIMENTAL E INFESTACIÓN EN *Pseudotsuga menziesii* POR EL TIZÓN SUIZO (*Phaeocryptopus gaeumannii*) EN AQUIXTLA, PUEBLA ⇌ NUTRITIONAL STATUS AND INFESTATION IN *Pseudotsuga menziesii* BY SWISS NEEDLE CAST (*Phaeocryptopus gaeumannii*) AT AQUIXTLA, PUEBLA

Iván Fermín **Quiroz-Ibáñez**, Víctor Manuel **Cetina-Alcalá**, Miguel Ángel **López-López**, Silvia Edith **García-Díaz**, J. Jesús **Vargas-Hernández** 797

EFFECTO ANTIFÚNGICO *in vitro* DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Capsicum* spp. EN *Moniliophthora roreri* ⇌ *In vitro* ANTIFUNGAL EFFECT OF METANOLIC EXTRACTS OF *Capsicum* spp. ON *Moniliophthora roreri*

Dario **De la Cruz-Ricardez**, Carlos F. **Ortiz-García**, Luz del C. **Lagunes-Espinoza**, Magdiel **Torres-de la Cruz** 813

Recursos Naturales Renovables ⇌ Natural Renewable Resources

CARACTERÍSTICAS DE AGUAJES ARTIFICIALES Y SU RELACIÓN CON EL USO POR LA FAUNA SILVESTRE EN COAHUILA, MÉXICO ⇌ CHARACTERISTICS OF ARTIFICIAL WATER SOURCES AND ITS RELATIONSHIP WITH THE USE BY WILDLIFE IN COAHUILA, MEXICO

Norma Alejandra **Ovalle-Rivera**, Luis Antonio **Tarango-Arámbula**, Eloy Alejandro **Lozano-Cavazos**, Juan Felipe **Martínez-Montoya**, Genaro **Olmos-Oropeza**, Fernando **González-Saldívar**, Saúl **Ugalde-Lezama** 825

DISEÑO DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICAR EMISIONES DE CO₂ (RESPIRACIÓN DEL SUELO) DURANTE INTERVALOS DIURNOS

CALIBRATION DESIGN TO QUANTIFY CO₂ EMISSIONS (SOIL RESPIRATION) DURING DAYTIME INTERVALS

Leticia Citlaly **López-Teloxa**¹, Alejandro Ismael **Monterroso-Rivas**², Jesús David **Gómez-Díaz**²

¹Fitotecnia, ²Suelos. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo Estado de México.
(citlaly_lo@hotmail.com).

RESUMEN

Las emisiones del suelo son el segundo flujo mayor de bióxido de carbono (CO₂) de la superficie terrestre a la atmósfera. Ese flujo depende de los organismos del suelo y las raíces de las plantas y es función de la temperatura, humedad y textura del suelo. El objetivo del presente estudio fue diseñar un método de cuantificación de emisiones de CO₂ y validarlo mediante un modelo de regresión que permita el desarrollo de un protocolo experimental mejor para el uso de una cámara de medición de flujos. La emisión del suelo se midió en un área cubierta por *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (Bermuda) con una cámara dinámica cerrada LICOR LI-8100A, integrada con un analizador infrarrojo de gases. También se determinaron la temperatura y humedad del suelo con sensores integrados, en cuatro diferentes intervalos diurnos entre toma de muestras. Los intervalos se estudiaron para buscar la mejor estimación de emisiones de CO₂, en condiciones ambientales diferentes y dos tiempos de observación: la primera de 240 s cada 5 min, durante 8 h. La segunda fue de 90 s con dos repeticiones cada 30, 60 y 120 min durante 12 h. Los resultados principales mostraron que existieron diferencias significativas en las muestras evaluadas a las 8:00 y 18:00 h; en otros horarios la respiración del suelo fue relativamente homogénea. El intervalo de medición ideal que describe la fluctuación espacial del CO₂ a lo largo del día y entre periodos diferentes de radiación solar fue de 120 min. La validación del modelo de regresión lineal determinó el 50% de la variación; y la restante se podría explicar por otras variables del desarrollo del pasto y las propiedades fisicoquímicas del suelo. El modelo presentó un error de $\pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y es importante señalar que se elaboró bajo condiciones de humedad de 0.42 a 0.53 m³ m⁻³ y temperatura de 17.6 a 30 °C.

ABSTRACT

Soil emissions account for the second largest flux of carbon dioxide (CO₂) from the Earth's surface to the atmosphere. This flux depends on the soil organisms and the plants roots and is based on soil temperature, soil moisture and texture. The aim of the present study was to design a method to quantify CO₂ emissions and to validate it using a regression model that helps develop an improved experimental model for the use of a flux measurement chamber. Soil emissions were measured in an area covered with *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (Bermuda) with a closed LICOR LI-8100A dynamic chamber equipped with an infrared gas analyzer. Soil temperature and moisture were also determined using built-in sensors, in four different daytime intervals between sample collections. The intervals were studied to find the best estimation of CO₂ emissions, under different environmental conditions and two observation times: the first one lasted 240 s every 5 min, for 8 h; the second one lasted 90 s with two repetitions every 30, 60 and 120 min for 12 h. The main results showed that there were significant differences in samples evaluated at 8:00 and 18:00; at other times, soil respiration was relatively homogenous. The ideal measurement interval that describes the spatial fluctuation of CO₂ throughout the day and between different periods of solar radiation was 120 min. The validation of the linear regression model determined 50% of the variation, and the rest could be explained with other variables such as grass development and soil physicochemical properties. The model presented an error of $\pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and it is worth mentioning that it was performed under soil moisture conditions between 0.42 and 0.53 m³ m⁻³ and a soil temperature between 17.6 and 30 °C.

Key words: closed dynamic chamber, soil respiration, gas analyzer, regression model, sun radiation.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: septiembre, 2019. Aprobado: mayo, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 731-745. 2020.

Palabras clave: cámara dinámica cerrada, respiración del suelo, analizador de gas, modelo de regresión, radiación solar.

INTRODUCCIÓN

El suelo es un importante reservorio de carbono, pero también es emisor significativo de CO₂. Las emisiones de CO₂ o respiración del suelo (RS) es un componente principal del ciclo global de carbono (Ryan *et al.*, 2018) porque resulta de los procesos biológicos de raíces y organismos edáficos, así como también de la descomposición de la materia orgánica. Según Ru *et al.* (2018) se le considera el segundo mayor flujo de carbono entre la tierra y la atmósfera. Sin embargo, los seres humanos continúan con la alteración de los ecosistemas e incrementan la emisión de gases de efecto invernadero provenientes del suelo (Gómez *et al.*, 2017). Las emisiones se acentúan por malas prácticas de manejo, como deforestación, quema de biomasa, drenaje en humedales, labranza y eliminación de residuos de cultivos (Chi *et al.*, 2020). Por lo tanto, es importante determinar las emisiones desde el suelo, y también cuáles son las prácticas y los usos de suelo que más aportan CO₂ asociado con la respiración.

La determinación cuantitativa de las emisiones de CO₂ derivadas del suelo puede contribuir a desarrollar herramientas de mitigación mejores; además, provee información detallada para fomentar cobeneficios entre estrategias de mitigación y adaptación al cambio climático, y que tendrán como base el manejo y la conservación del suelo. Lo anterior tiene la finalidad de reducir las emisiones de bióxido de carbono a la atmósfera (Serran *et al.*, 2017) y lograr adaptaciones al cambio climático.

Para la determinación de las emisiones de CO₂ provenientes del suelo existen diversos métodos, aunque la técnica más usada para determinar las tasas de CO₂ es cuantificar un sistema de cámaras. Hasta ahora hay tres tipos: cámaras estáticas cerradas, cámaras dinámicas cerradas y cámaras dinámicas abiertas (Cueva *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2011). Los sistemas de cámaras dinámicas abiertas determinan la tasa de respiración al medir la concentración atmosférica de CO₂ y la del interior de la cámara. En las cámaras cerradas, ya sean dinámicas o estáticas, el flujo de CO₂ se determina por el aumento en la concentración en la cámara, la cual se coloca en un área conocida por un período de tiempo determinado. Las cámaras

INTRODUCTION

Soil is an important carbon reservoir, but it is also a significant source of CO₂. CO₂ emissions, or soil respiration (SR) is a main component of the global carbon cycle (Ryan *et al.*, 2018), since it is a result of all biological processes of roots and soil organisms, as well as of the decomposition of organic matter. According to Ru *et al.* (2018), it is considered the second largest carbon flux between Earth and the atmosphere. However, humans continue to degrade ecosystems and increase the greenhouse gases emission from the soil (Gómez *et al.*, 2017). These emissions are increased by inadequate management practices such as deforestation, burning biomass, drain wetlands, tilling and eliminating crop residues (Chi *et al.*, 2020). Therefore, it is important to determine soil emissions, but also the practices and soil uses that contribute the most respiration-related CO₂ emissions.

The quantitative determination of soil CO₂ emissions may contribute to the development of better mitigation tools. It also provides detailed information to promote co-benefits between strategies for the mitigation of, and adaptation to, climate change, and will be based on soil management and conservation. The purpose of this is to reduce carbon dioxide emissions into the atmosphere (Serran *et al.*, 2017) and achieve adaptations to climate change.

There are several methods to determine CO₂ emissions from the soil, although the most widely used technique to determine CO₂ rates is by quantifying a system of chambers. Nowadays, there are three types: closed static chambers, closed dynamic chambers and open dynamic chambers (Cueva *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2011). The open dynamic chamber systems determine the respiration rate when measuring the atmospheric concentration of CO₂, as well as inside the chamber. In closed chambers, whether dynamic or static, the CO₂ flux is determined by the increase in concentration inside the chamber, which is placed in a known area for a specific time period. Closed dynamic chambers estimate CO₂ using an analyzer of gases in the infrared spectrum, while static ones do the same by chemical absorption (Bain *et al.*, 2005). Bradford and Ryan (2008) suggested using closed dynamic chambers due to their cost efficiency, because they are portable and they produce accurate results. Additionally, the variations of CO₂ emissions

cerradas dinámicas estiman el CO₂ por medio de un analizador de gases en el espectro infrarrojo, mientras que la estática lo hace por absorción química (Bain *et al.*, 2005). Bradford y Ryan (2008) sugirieron utilizar las cámaras dinámicas cerradas por su costo eficientes, portátiles, y generar resultados certeros. Además, las variaciones que se obtienen en las emisiones de CO₂ se deben con frecuencia a las condiciones ambientales, la composición y abundancia de la vegetación, o la calidad del sustrato o del suelo; pero no a errores en el equipo.

La emisión de CO₂ en suelos de California, en un ecosistema de sabana con elementos leñosos y herbáceas es 2.29 μmol de CO₂ m⁻² s⁻¹ como componente de respiración, y de 1.40 μmol de CO₂ m⁻² s⁻¹ en suelos desprovistos de cobertura vegetal en temporada húmeda; estos valores se atribuyen sobre todo a la respiración de las raíces. En cambio, las praderas de humedales alpinos no degradados de China presentaron un flujo de 4.26 μmol de CO₂ m⁻² s⁻¹ en el inicio de la temporada de crecimiento, y a mitad de la temporada, 7.86 μmol de CO₂ m⁻² s⁻¹; pero los mismos sistemas con degradación severa emitieron 48.4% menos en la temporada de crecimiento y 62.6% menos a la mitad de esta (Li *et al.*, 2019). En México, los pastizales presentan tasas altas de emisión de CO₂ de 3.5 a 5.0 μmol de CO₂ m⁻² s⁻¹, durante la mañana y la tarde, respectivamente. En contraste, en sorgo las tasas más bajas de respiración del suelo son 1.9 y 2.5 μmol de CO₂ m⁻² s⁻¹ en los mismos periodos de tiempo que el pastizal, de acuerdo con Cantú *et al.* (2010).

Los flujos varían con el ecosistema, la época del año y las condiciones del suelo, en especial temperatura y humedad del suelo (Dowhower *et al.*, 2020). Por eso, es importante diseñar y establecer la metodología adecuada para la obtención de resultados certeros. La hipótesis fue que sí existe diferencia en las emisiones de CO₂ a lo largo del día y existe un intervalo de tiempo ideal entre muestreos que produce resultados certeros sobre la fluctuación temporal del CO₂ del suelo. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue diseñar un método de cuantificación de emisiones de CO₂ y validar mediante un modelo de regresión el desarrollo de un protocolo experimental mejor para el uso de una cámara de medición de flujos.

obtained are frequently due to weather conditions, plant composition and abundance, or the quality of the soil substrate, but not to errors in the equipment.

Carbon dioxide emissions from California soils, in a savannah ecosystem with woody and herbaceous elements is 2.29 μmol of CO₂ m⁻² s⁻¹ as a respiration component, and 1.40 μmol of CO₂ m⁻² s⁻¹ in soils without plant coverage in rainy season; these values are mainly attributed to root respiration. The undegraded alpine wetland prairies in China presented a flux of 4.26 μmol of CO₂ m⁻² s⁻¹ at the start of the growing season, and 7.86 μmol of CO₂ m⁻² s⁻¹ in the middle of the season, although the same systems with severely degraded systems emitted 48.4% less in the growing season, and 62.6% less in the middle of the same season (Li *et al.*, 2019). In Mexico, grasslands present high CO₂ emission rates between 3.5 and 5.0 μmol of CO₂ m⁻² s⁻¹, in the morning and afternoon, respectively. By contrast, in sorghum, the lowest respiration rates are 1.9 and 2.5 μmol of CO₂ m⁻² s⁻¹ in the same periods of time as the grasslands, according to Cantú *et al.* (2010).

Fluxes vary with the ecosystem, the time of year and the soil conditions, particularly soil temperature and moisture (Dowhower *et al.*, 2020). Due to this, it is important to design and establish the appropriate methodology to obtain accurate results. The hypothesis was that there are differences in CO₂ emissions throughout the day, and there is an ideal time interval between sample records, which produces accurate results on the time fluctuation of soil CO₂. Therefore, the aim of this study was to design a method to quantify soil CO₂ emissions and, using a regression model, validate the development of a better experimental protocol for the use of a flux measurement chamber.

MATERIALS AND METHODS

Study site description

The chosen area for research and equipment calibration was a land covered with common *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (Bermuda) grass at Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Mexico with an altitude of 2250 m, temperate sub-humid climate with a mean annual temperature of 17.2 °C and mean

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del sitio

El área elegida para la calibración del equipo y la investigación fue una cubierta de pasto común *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (Bermuda) en la Universidad Autónoma Chapingo, municipio de Texcoco de Mora, México. A 2250 m de altitud, clima predominante templado subhúmedo con temperatura media anual de 17.2 °C y precipitación media de 618.3 mm, con distribución de lluvias en verano. Esta cobertura se seleccionó de acuerdo con Dunne y Leopold (1978) para la cuantificación de la evapotranspiración potencial (ETP). La especie de pasto seleccionada es la más usada en campos deportivos, y presenta algunas ventajas como tolerancia a temperaturas bajas, recuperación rápida después de un pisoteo o corte, resistencia adecuada a enfermedades y adaptación a condiciones de drenaje variables (Laurencena *et al.*, 2009).

Registros meteorológicos diarios se obtuvieron con una estación meteorológica portátil (La Crosse Technology Mod. C86234) colocada a 1.5 m de altura y a 1 m de distancia de la cámara de medición y toma de muestras. Además, los datos se corroboraron con la estación meteorológica automática Chapingo (MX25) operada por el Organismo de Cuenca y Aguas del Valle de México (OCAVM) (<https://smn.cna.gob.mx/es/estaciones-meteorologicas-automaticas-3>).

Emisiones de CO₂ provenientes del suelo

Cuatro intervalos entre toma de muestras se estudiaron para buscar el mejor estimador de emisiones de CO₂ y hacer la toma de muestras más eficiente en campo, para obtener resultados confiables en condiciones ambientales diferentes.

Las emisiones de CO₂ del suelo se midieron con una cámara dinámica cerrada (Bradford y Ryan, 2008; LI-COR Biosciences, 2015) integrada con un analizador infrarrojo de gases (IRGA) y una cámara de volumen conocido colocada en el suelo (Modelo 8100-104). La ventaja de la cámara es que realiza mediciones instantáneas de la concentración de CO₂, permite mayor rapidez, agilidad al tomar réplicas y reduce la probabilidad de error (Cueva *et al.*, 2012; Davidson *et al.*, 2002). En conjunto miden la concentración de CO₂ dentro de la cámara y determinan el flujo de salida mediante el ajuste de la cámara a un collar de cloruro de polivinilo.

Además, se midieron la temperatura y humedad del suelo con dos sensores adjuntos, p/n8150-203 Soil Temperature Probe y 8100-204 Theta Soil Moisture Probe, respectivamente. Los collares en el suelo se instalaron 12 h antes de realizar la primera medición para reducir el error asociado con esta perturbación del

annual rainfall of 618.3 mm with the summer raining season. This coverage was chosen following Dunne and Leopold (1978) report for the quantification of potential evapotranspiration (PET). The selected grass species is the most widely used in sports fields, and presents some advantages such as tolerance to low temperatures, quick recovery after treading or cutting, adequate resistance to diseases and it adapts to variable drainage conditions (Laurencena *et al.*, 2009).

Weather variables were registered daily at daytime hours using a portable weather station (La Crosse Technology Mod. C86234), placed 1.5 m above the ground and 1 m away from the measurement chamber and sample collection. In addition, the data were verified with the Chapingo automatic weather station (MX25) run by the Mexico Valley Water Basin Organism (in Spanish, OCAVM) (<https://smn.cna.gob.mx/es/estaciones-meteorologicas-automaticas-3>).

CO₂ Emissions from the soil

Four intervals between each sample collection were studied to search for the best CO₂ emission estimator and make field sample collections more efficient in order to obtain reliable results under different weather conditions.

The CO₂ emissions from the soil were measured using a closed dynamic chamber (Bradford and Ryan, 2008; LI-COR Biosciences, 2015) with a built-in Infrared Gas Analyzer (IRGA) and a known volume chamber that is placed on the soil surface (Model 8100-104). The advantage of the chamber is that it takes instant measurements of the CO₂ concentration, it provides speed, agility in replicating records and it reduces the probability of errors (Cueva *et al.*, 2012; Davidson *et al.*, 2002). Altogether, they measure the CO₂ concentration inside the chamber and determine the outflow by fitting the camera through a polyvinyl chloride collar.

Besides, soil temperature and moisture were measured with two attached sensors: p/n8150-203 Soil Temperature Probe and 8100-204 Theta Soil Moisture Probe, respectively. The collars in the soil were installed 12 h before taking the first measurement to reduce the error related to this soil disruption. Clough *et al.* (2015), Davidson *et al.* (2000) and Parkin and Venterea (2010) explained that this is required, since the soil is disrupted during collar installation, which can break roots and the pressure exerted on the base may compact the soil.

The CO₂ accumulated in the chamber was measured as CO₂ mmol mol⁻¹ of dry air, in two observation times: first was 240 s every 5 min, for 8 h, and the second lasted 90 s with two repetitions every 30, 60 and 120 min for 12 h. All measurements were programmed with 30 s of dead band, pre-purged for 60 s and post-purged for 30 s. The CO₂ flux values were calculated

suelo. Clough *et al.* (2015), Davidson *et al.* (2000) y Parkin y Venterea (2010) explicaron que esto es necesario porque se realiza una perturbación en el suelo durante el proceso de instalación del collar que puede consistir en la ruptura de raíces, y la fuerza ejercida sobre la base puede generar una compactación del suelo.

El CO₂ acumulado en la cámara se midió como CO₂ mmol mol⁻¹ de aire seco, en dos tiempos de observación: el primero de 240 s cada 5 min durante 8 h. El segundo fue de 90 s con dos repeticiones cada 30, 60 y 120 min durante 12 h. Todas las mediciones se programaron con 30 s de banda muerta, pre-purga de 60 s y pos-purga de 30 s. Los valores del flujo de CO₂ se calcularon con la siguiente ecuación y se expresaron como CO₂ μmol m⁻² s⁻¹:

$$F_c = \frac{10VP_0 \left(1 - \frac{w_0}{1000}\right) \partial C'}{RS(T_0 + 273.15) \partial t}$$

donde F_c es la tasa de flujo de CO₂ del suelo (μmol m⁻² s⁻¹), V es el volumen (cm³), P_0 es la presión inicial (kPa), W_0 es la fracción de mol de vapor de agua inicial (mmol mol⁻¹), R es la constante de gas (8.314 Pa m³ K⁻¹ mol⁻¹), S es el área de la superficie del suelo (cm²), T_0 es la temperatura inicial del aire (°C), y $\frac{\partial C'}{\partial t}$ es la tasa de cambio inicial en la fracción molar de CO₂ corregida por el agua (μmol mol⁻¹).

Diseño experimental

El diseño fue realizar dos pruebas. La primera fue buscar diferencias entre tres condiciones ambientales: 1) tiempo entre mediciones, 2) exposición al sol, y 3) hora del día, con la finalidad de seleccionar el intervalo de tiempo ideal para la cuantificación de emisiones de CO₂. La segunda prueba se realizó una vez seleccionados los intervalos de muestreos para cuantificar emisiones de CO₂, los datos se tomaron durante 7 d seguidos en cada intervalo, para obtener datos diurnos y nocturnos (cada 30 y 120 min).

Bradford y Ryan (2008) recomendaron mediciones de la respiración del suelo en intervalos cada 2 a 4 h, para caracterizar la variabilidad temporal en la emisión de CO₂ del suelo. Por lo tanto, para esta investigación el tiempo entre toma de muestras se completó con cuatro mediciones: cada 5, 30, 60 y 120 min. El sistema de la cámara permite ajustar los tiempos como sea conveniente al investigador.

De acuerdo con la primera prueba, el tiempo entre mediciones consistió en la toma de datos cada 5, 30, 60 y 120 min. Las situaciones de exposición al sol fueron dos: un área de pastos con 8 h de sol al día y sembrados desde hace aproximadamente 50 años, el cual se consideró como testigo con intervalo de me-

with the following equation and were expressed as CO₂ μmol m⁻² s⁻¹:

$$F_c = \frac{10VP_0 \left(1 - \frac{w_0}{1000}\right) \partial C'}{RS(T_0 + 273.15) \partial t}$$

where F_c is the soil CO₂ efflux rate (μmol m⁻² s⁻¹), V is the volume (cm³), P_0 is the initial pressure (kPa), w_0 is the initial water vapor mole fraction (mmol mol⁻¹), R is the gas constant (8.314 Pa m³ K⁻¹ mol⁻¹), S is soil surface area (cm²), T_0 is the initial air temperature (°C), and $\frac{\partial C'}{\partial t}$ is the initial rate of change in water-corrected CO₂ mole fraction (μmol mol⁻¹).

Experimental design

The design consisted in performing two tests, the first of which involved searching for differences between three environmental conditions: 1) time between measurements, 2) sunlight exposure, and 3) measurement hour, in order to select the ideal time interval for the quantification of CO₂ emissions. The second test was carried out once the sampling intervals for the quantifications of CO₂ emissions were selected, data were taken for 7 consecutive days in each interval to obtain data during sunlight and at night time (every 30 and 120 min).

Bradford and Ryan (2008) recommended soil respiration measurements in intervals of 2 to 4 h, to characterize the temporary variability in soil CO₂ emission. Therefore, for this field investigation, time between sample collections contained four measurements: every 5, 30, 60 and 120 min. The chamber system allows adjusting times, as required by the researcher.

According to the first test, times between measurements consisted in taking data every 5, 30, 60 and 120 min. Circumstances regarding sun exposure were two: an area of grass with 8 h of sunlight per day and planted for approximately 50 years, which was considered a control with measuring interval every 30 min (measurements at other intervals were assumed constant). And, one area with grass mostly in the shade, a maximum of 3 h of sunlight per day and planted for approximately 20 years, where measurements were taken at the 4 intervals. Regarding daytime hours, samples were grouped in three periods: morning (MA, 08:00 to 11:59 h), midday (ME, 12:00 to 15:59 h) and afternoon (TA, 14:00 to 19:59 h). Every measurement interval was performed for 8 h, data was taken with two repetitions, for a total of 280 measurements.

After analyzing the first stage, the second test was carried out on grasses with 8 h of sunlight per day for 168 h non-stop (intervals every 30 and 120 min), data were taken with two replications, for a total of 840 measurements

dición de cada 30 min (las mediciones en los otros intervalos se supusieron constantes). Y un área de pastos en su mayoría a la sombra y máximo 3 h de sol al día, sembrados desde hace aproximadamente 20 años, donde se realizaron las mediciones en los cuatro intervalos. Las muestras se agruparon en tres períodos: mañana (MA, 08:00 a 11:59), medio día (ME, 12:00 a 15:59) y tarde (TA, 14:00 a 19:59). Cada intervalo de medición se realizó durante 8 h seguidas, cada toma de datos con dos repeticiones, para un total de 280 mediciones.

Después de analizar la primera etapa, la segunda prueba se realizó en pastos con 8 h de sol al día durante 168 h continuas (intervalos cada 30 y 120 min), y cada toma de datos con dos repeticiones para un total de 840 mediciones.

Análisis estadístico

Para identificar diferencias estadísticamente significativas en los valores de CO₂ entre muestreo y periodos del día se realizó un ANDEVA. Las diferencias estadísticas entre las medias se identificaron con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), de acuerdo con Pompa y Sigala (2017). Con el modelo de efectos mixtos lineales (LMM) se probó si la temperatura ambiental, precipitación, humedad del suelo, temperatura del suelo (datos aleatorios) y horarios e intervalo de muestreo (datos fijos) tuvieron efecto significativo en las emisiones de CO₂ del suelo (Tiruvaimozhi y Sankaran, 2019). Con el modelo de regresión lineal se exploró la variabilidad para determinar el efecto de la interacción entre variables que mejor describiera el comportamiento de las emisiones de CO₂, para estudiar la relación y predecir la tasa de CO₂ liberado a la atmosfera. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Minitab R 18.1 (Minitab Inc., 2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El total de mediciones (537) se distribuyó en 243 datos cada 5 min, cada 30 min fue 210 datos, 54 datos cada 60 min, y 30 datos cada 120 min. Este total de datos analizados mostró la intensidad de emisiones, durante cinco días de junio de 2019 (Figura 1). Las emisiones de CO₂ del suelo o respiración del suelo (Serran *et al.*, 2017; Tang y Baldocchi, 2005) provienen del metabolismo microbiano, raíces y la tasa de mineralización de la materia orgánica del suelo (Tang y Baldocchi, 2005). En nuestro estudio no se consideraron variaciones en las variables anteriores, ni tampoco en época del año ni otras variables reales en campo.

Las emisiones de CO₂ en los pastos fluctuaron de 3 a 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y aumentaron al medio día, con

Statistical analysis

In order to identify statistically significant differences in the values of CO₂ between sampling and daytime hours, an ANOVA was carried out. The statistical differences between means were identified using Tukey's test ($p \leq 0.05$), following Pompa and Sigala (2017). With the linear mixed effect model (LMM) we tested whether ambient temperature, rainfall, soil moisture, soil temperature (random data), daytime hours and sampling intervals (fixed data) had a significant effect on the soil CO₂ emissions (Tiruvaimozhi and Sankaran, 2019). The linear regression model was used to explore the variability to determine the effects of the interaction between variables that better describe the behavior of CO₂ emissions in order to study the relation and predict the rate of CO₂ released into the atmosphere. All the statistical analyses were carried out using the software Minitab R 18.1 (Minitab Inc., 2017).

RESULTS AND DISCUSSION

The total of measurements (537) was distributed in 243 data every 5 min, every 30 min it was 210 data, 54 data every 60 min, and 30 data every 120 min. These analyzed data showed the intensity of emissions during five days in June, 2019 (Figure 1). Soil CO₂ emissions or soil respiration (Serran *et al.*, 2017; Tang and Baldocchi, 2005) come from the microbial metabolism, roots and the mineralization rate of soil organic matter (Tang and Baldocchi, 2005). Our study did not consider variations in the previous variables, in the time of year or other factual variables on the field.

CO₂ emissions in grasses fluctuated from 3 to 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and increased at midday, with the highest values between 13:00 and 15:00 h, except the samples taken every 30 min in grasses under shade, which increased at 20:00 h. In all five cases, soil temperature increased during the day from 13 to 25 °C. The opposite occurred for soil moisture, which dropped in the evaluated period, with a variation interval in the data from 0.32 to 0.47 $\text{m}^3 \text{m}^{-3}$. According to the Pearson correlation index, there was a positive correlation between CO₂ emissions and temperature, followed by a negative correlation with soil moisture (Table 1), which agrees with findings by Abdalla *et al.* (2018) and Cantú *et al.* (2010). According to Serran *et al.* (2017) and Tang and Baldocchi (2005), soil temperature and moisture explain the greater amount of variation in soil CO₂

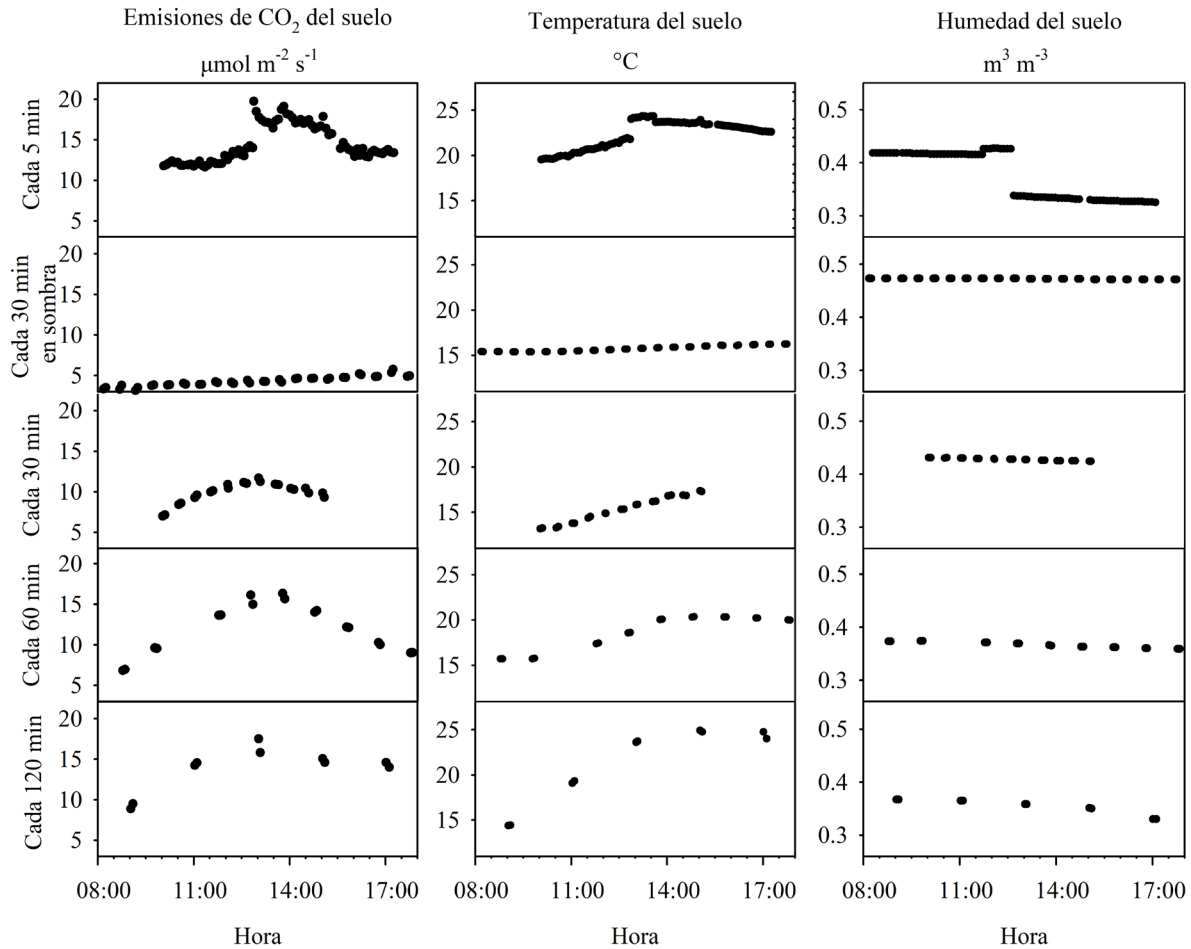


Figura 1. Emisiones de CO₂, temperatura y humedad del suelo según muestreos cada 5, 30 (luz/sombra), 60 y 120 minutos.
 Figure 1. CO₂ emissions, temperature and moisture of soil in samples every 5, 30 (light/shade), 60 and 120 min.

los valores más altos entre 13:00 y 15:00, excepto el muestreo realizado en pastos bajo sombra a cada 30 min, que aumentaron hasta las 20:00 h. En los cinco casos la temperatura del suelo incrementó durante el día, de 13 a 25 °C. Caso contrario fue la humedad del suelo, la cual disminuyó en el periodo de tiempo evaluado, con un intervalo de variación en los datos de 0.32 a 0.47 m³ m⁻³. De acuerdo con el índice de correlación de Pearson hubo una correlación positiva alta entre emisión de CO₂ con la temperatura, seguida de una correlación negativa con la humedad (Cuadro 1), lo cual concuerda con lo encontrado por Abdalla *et al.* (2018) y Cantú *et al.* (2010). Según Serran *et al.* (2017) y Tang y Baldocchi (2005) la temperatura y humedad del suelo explican la cantidad mayor de variación de los flujos de CO₂ provenientes del suelo en el corto plazo. Por lo anterior, al final se registraron solo la temperatura y humedad del suelo.

flux in the short term. Due to this, in the end, only soil temperature and moisture were registered.

The results of the analysis of variance of the measurements were performed with the 3 factors of the sampling protocol to determine the variability of the soil variables with the environmental factors (sunlight exposure and measurement hour) and sample collection intervals. CO₂ emissions, soil temperature and moisture variables were significant ($p \leq 0.05$) according to the sunlight exposure, sampling and measurement hour, and their combinations.

The average values of soil CO₂, temperature and moisture according to the type of sampling and measurement hour showed that, according to the tests performed, CO₂ emissions and soil moisture showed no significant differences among sample records every 5, 60 and 120 min; however, they did

Los resultados del análisis de varianza de las mediciones se realizaron con los tres factores del protocolo de muestreo para determinar la variabilidad de las variables del suelo ante los factores ambientales (exposición al sol y periodo del día) e intervalos de muestreo. En las variables emisiones de CO₂, temperatura y humedad del suelo, hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con exposición al sol, muestreo y periodo del día, y sus combinaciones.

Los valores promedio de CO₂, temperatura y humedad del suelo según el tipo de muestreo y periodo del día mostraron que, de acuerdo con las pruebas realizadas, las emisiones de CO₂ y humedad del suelo no presentaron diferencias significativas entre tomas cada 5, 60 y 120 min; pero sí variaron en los muestreos realizados en relación con la temperatura. Los promedios de CO₂ y humedad del suelo realizados en intervalos de 30 min sí presentaron diferencias estadísticas (Figura 2).

Las intensidades de muestreo cada 5 min y 60 min son descartables (Figura 1 y Figura 2 A y B). El primer caso presenta variaciones elevadas y son datos inciertos, porque al permanecer cerrada la cámara por más tiempo, el CO₂ en su interior se almacena, cambia el gradiente de concentración de CO₂ del suelo al aire, y se genera una acumulación de vapor de agua (Welles *et al.*, 2001). El segundo intervalo no presentó diferencia estadística con los muestreos realizados cada 120 min, así como existió diferencia mayor entre el periodo de la mañana (8:00 a 11:59 h) con el medio día y la tarde (12:00 a 15:59 h y 14:00 a 19:59). Lo anterior se debe principalmente a que diferentes factores bióticos y abióticos regulan las emisiones de CO₂ provenientes del suelo; entre ellos destacan temperatura, contenido de humedad, nutrientes, tipo vegetación, actividad fotosintética o desarrollo fenológico de la planta, así como por la biomasa de raíces finas y microbiana (Cantú *et al.*, 2010; Cueva *et al.*, 2012).

Para comparar con mejor detalle los horarios de muestreo y obtener representatividad importante en las emisiones de CO₂, se realizaron dos jornadas de mediciones de 168 h cada una. Datos diurnos y nocturnos se registraron en conjunto con temperatura ambiental y precipitación, porque estos factores influyen en la dinámica de las emisiones de CO₂ del suelo (Tiruvaimozhi y Sankaran, 2019). El total de mediciones cada 30 min fue 1740 datos y cada 120 min 408 datos.

Cuadro 1. Pruebas de correlación simple entre las variables CO₂, temperatura y humedad medidas en los suelos estudiados.

Table 1. Simple correlation tests between the variables CO₂, temperature and moisture as recorded in the study.

	CO ₂	Temperatura suelo
Temperatura suelo	0.857 (0.000)	
Humedad del suelo	-0.782 (0.000)	-0.736 (0.000)

Cada prueba indica el coeficiente de correlación de Pearson y el valor de probabilidad (p). ♦ Each test indicates the Pearson correlation coefficient and the probability value (p).

vary in relation to temperature. Averages of CO₂ and soil moisture recorded every 30 min did present statistical differences (Figure 2).

The intensities of the sample record every 5 min and 60 min are negligible (Figure 1 and Figure 2 A and B). The first case presents elevated variations and are uncertain data, because keeping the chamber closed for a longer time leads to CO₂ storage inside, which changes the CO₂ concentration gradient between the soil and air, also leading to an accumulation of water vapor (Welles *et al.*, 2001). The second interval showed no statistical difference within samples every 120 min; likewise, there was a greater difference between the morning (8:00 a 11:59 h) and midday / afternoon (12:00 to 15:59 h and 14:00 to 19:59). These results are mainly due to different biotic and abiotic factors, regulating soil CO₂ emissions, and the most important are temperature, moisture content, nutrients, vegetation type, photosynthetic activity or phenological development of the plant, as well as by fine roots biomass and microbial biomass (Cantú *et al.*, 2010; Cueva *et al.*, 2012).

In order to compare sampling daytime hours in greater detail and to obtain an important representation of CO₂ emissions, we held two measurement sessions, each one lasting 168 h. Daytime and night-time data were recorded, along with environmental temperature and rainfall, since these two factors influence the dynamics of soil CO₂ emission (Tiruvaimozhi and Sankaran, 2019). Total of measurements every 30 min was 1740 data, and every 120 min 408 recorded data.

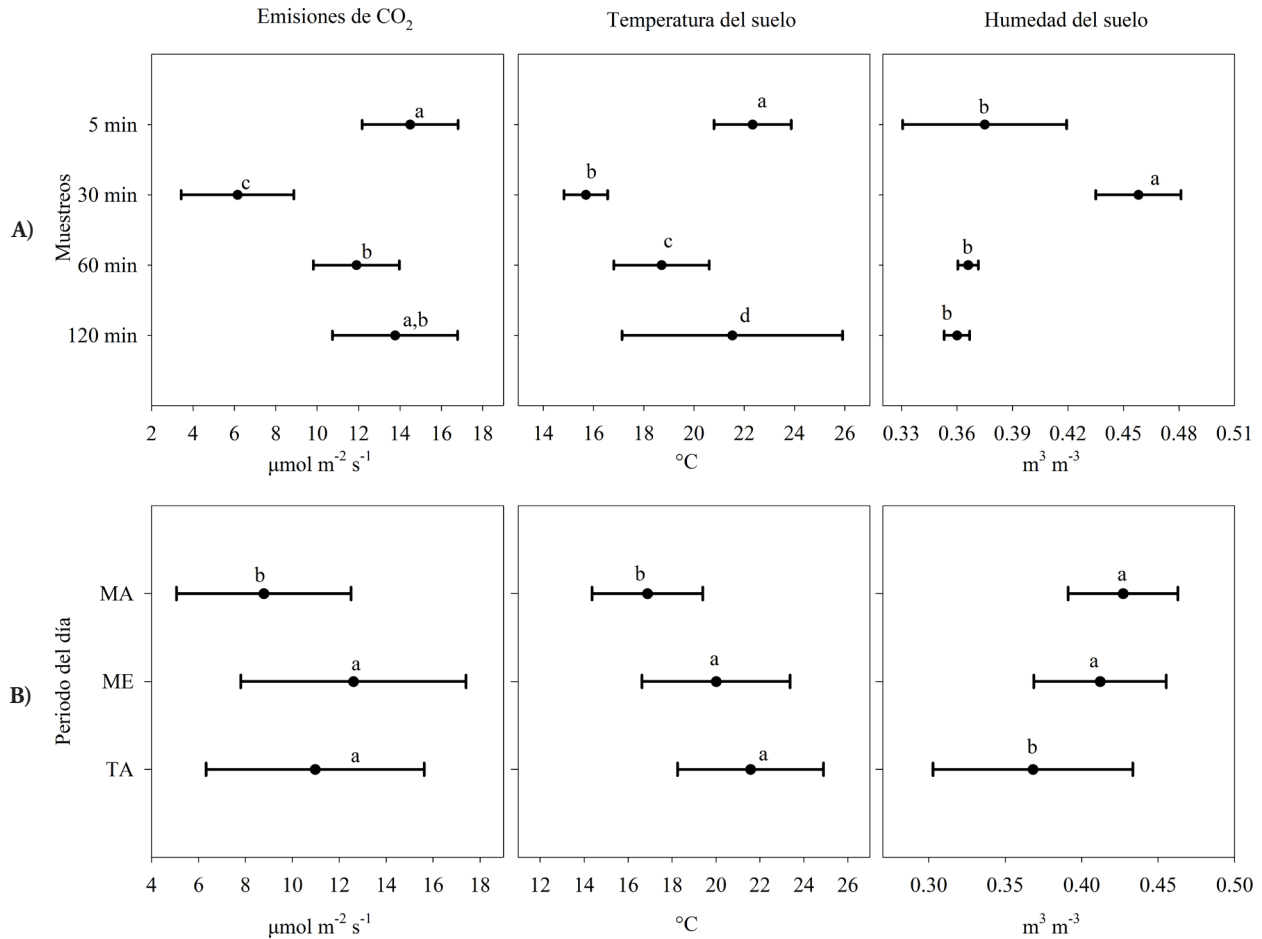


Figura 2. Promedio de emisiones de CO₂, así como temperatura y humedad del suelo. A) muestreos; B) periodo del día: MA = mañana, ME = medio día, y TA = tarde. Las letras a, b y c indican diferencias significativas (Tukey; $p \leq 0.05$).

Figure 2. Average soil CO₂ emissions, as well as temperature and moisture. A) measurement hour; B) period of the day: MA: morning; ME: midday; TA: evening. Letters a, b and c indicate significant differences (Tukey; $p \leq 0.05$).

El total de datos analizados constituye una intensidad de muestreo de 2148 datos, registrados durante 14 d en junio (verano de 2019). Las emisiones de CO₂ y sus variaciones durante 8 d de muestreo se compararon con la temperatura ambiental y del suelo; también con humedad del suelo y precipitación, en intervalos de medición de 30 min (Figura 3) y 120 min (Figura 4). Las mediciones se realizaron con eventos de lluvia porque, según Murcia y Ochoa (2008), en periodos secos las emisiones nocturnas tienden a ser más altas debido a la evaporación que favorece el flujo mayor de CO₂ a la atmósfera.

El modelo lineal mixto comprueba que las emisiones de CO₂ tienen relación mayor con los horarios ($p \leq 0.05$) mientras que por intervalos de muestreo

Data analyzed constitutes a sample density of 2148 data, registered throughout 14 d in June (summer of 2019). The CO₂ emissions and their variations for 8 d of sample collection were compared with environmental and soil temperatures, as well as with soil moisture and rainfall, in measurement intervals every 30 min (Figure 3) and 120 min (Figure 4). The measurements were recorded with every rainfall event because, according to Murcia and Ochoa (2008), in dry periods, night-time emissions tend to be higher due to evaporation, which favors a greater CO₂ flux into the atmosphere.

The mixed linear model proves that the CO₂ emissions have a higher relation with daytime hours ($p \leq 0.05$), whereas by sampling intervals, differences

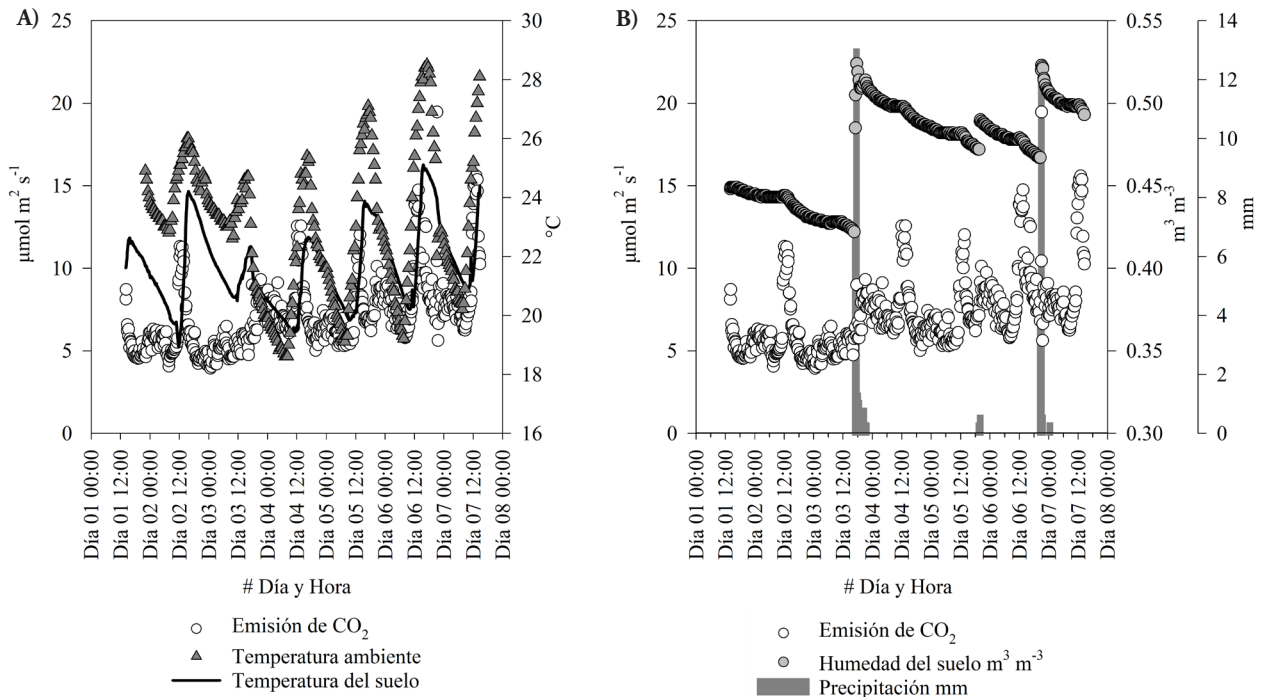


Figura 3. Emisiones de CO₂ en intervalos de 30 min comparado con A) temperatura ambiental y del suelo, B) humedad del suelo y precipitación.

Figure 3. CO₂ emissions in 30 min intervals compared to A) environmental and soil temperatures, B) soil moisture and rainfall.

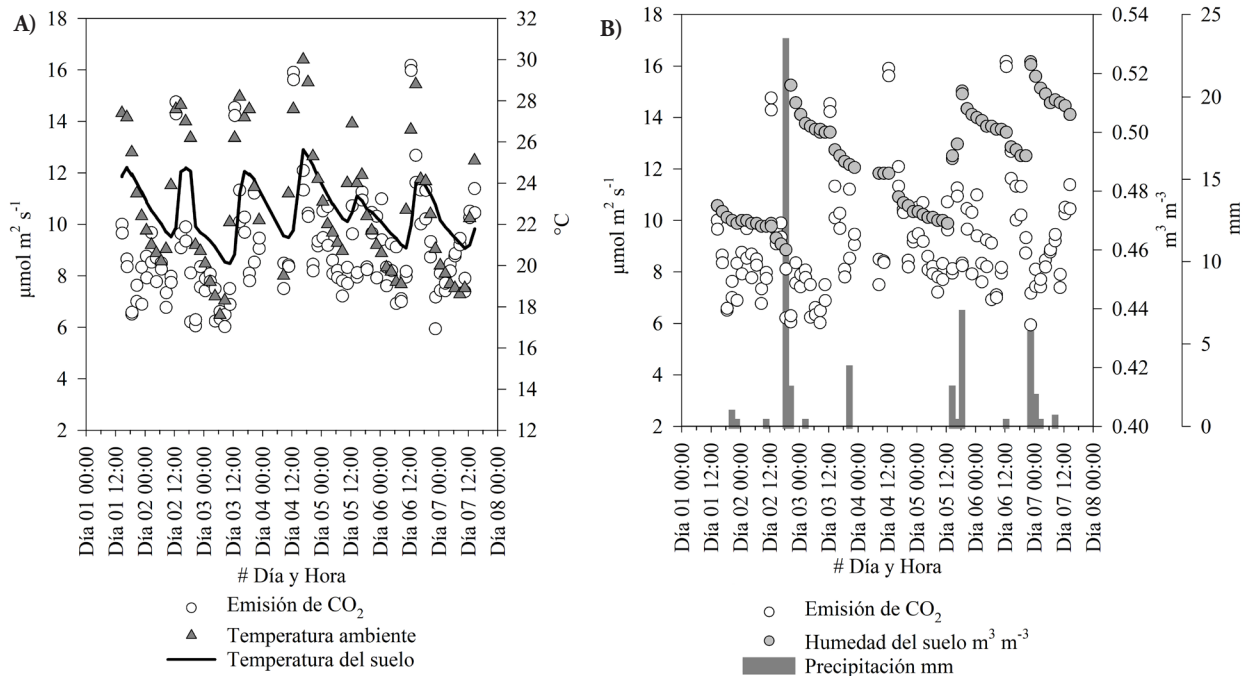


Figura 4. Emisiones de CO₂ en intervalos de 120 min comparado con A) temperatura ambiental y del suelo, B) humedad del suelo y precipitación.

Figure 4. CO₂ emissions in 120 min intervals compared to: A) environmental and soil temperatures, B) soil moisture and rainfall.

las diferencias no son significativas ($p > 0.05$). Sin embargo, presenta un ajuste mejor (Figura 3) en intervalos cada 120 min (R^2 ajustada = 97.48%) y ajuste menor (Figura 4) en intervalos de 30 min (R^2 ajustada=93.20%). Hay una asociación estadísticamente significativa con temperatura ambiental ($p=0.00$), precipitación ($p=0.01$) y humedad de suelo ($p=0.00$), y no la hay con la temperatura del suelo ($p=0.44$). Esto concuerda con lo observado por Tiruvaimozhi y Sankaran (2019) en praderas montañosas y por Murcia y Ochoa (2008) en pastizales, donde la temperatura del suelo es un predictor débil de la respiración del suelo.

Además, la humedad es el factor principal que influye en la emisión de CO₂, por su influencia en factores fisiológicos, bioquímicos y ecológicos, como la disponibilidad de sustratos en descomposición, la movilidad de nutrientes y materia orgánica disuelta. Las tasas de respiración del suelo pueden aumentar entre el invierno y el verano, no solo porque los suelos se calientan, sino también porque el contenido de agua disminuye desde las condiciones saturadas en el invierno hasta los contenidos de agua óptimos a principios del verano (Davidson *et al.*, 2000).

La relación entre el CO₂ proveniente del suelo y la temperatura ambiental es fundamental para investigar como los cambios de la temperatura global pueden influir sobre las tasas de emisiones del suelo (Murcia y Ochoa, 2012, 2008; Raich *et al.*, 2002). Con base en esto y en los resultados obtenidos por el modelo lineal general ($p \leq 0.05$) y de acuerdo con Murcia y Ochoa (2008), quienes encontraron que las emisiones son homogéneas durante la noche en determinadas estaciones del año, los horarios ideales para la medición de CO₂ mediante la cámara de flujo LI-COR 8100A son: 08:00, 10:00, 12:00 y 14:00, y buenos aunque menos convenientes, 16:00 y 18:00 (Cuadro 2), en dos intervalos cada 30 y 120 min. Algunos horarios coinciden con lo establecido por Villanueva *et al.* (2014) quienes realizaron cuatro mediciones al día a cada 6 h: 00:00, 06:00, 12:00 y 18:00 en sistemas silvopastoriles.

Davidson *et al.* (2000) y Murcia y Ochoa (2008) encontraron que la temperatura del suelo es relativamente constante durante la noche y no presenta una relación significativa con las emisiones de CO₂. La relación entre la emisión de CO₂ y la temperatura con frecuencia se describe por una función exponencial. Por eso a nivel local, las variaciones en la temperatura

are not significant ($p > 0.05$). However, it displays a better fit (Figure 3) at intervals of 120 min (R^2 adjusted = 97.48%) and a lower fit (Figure 4) at intervals of 30 min (R^2 adjusted = 93.20%). There is a statistically significant relation with air temperature ($p=0.00$), rainfall ($p=0.01$) and soil moisture ($p=0.00$), and there is none with soil temperature ($p=0.44$). These agrees with those findings by Tiruvaimozhi and Sankaran (2019) in hilly grasslands, and by Murcia and Ochoa (2008) in grasslands, where the soil temperature is a weak predictor of soil respiration.

In addition, moisture is the driver contributing to CO₂ emission, due to its influence on physiological, biochemical and ecological factors such as the availability of substrates in decomposition, the mobility of nutrients and dissolved organic matter. Soil respiration rates can increase between winter and summer, not only because soils heat up, but also because water contents fall, from saturated conditions in the winter, to optimum water contents in the early summer (Davidson *et al.*, 2000).

The relation between CO₂ from the soil and environmental temperature is key to investigating how global temperature changes can influence soil emission rates (Murcia and Ochoa, 2012, 2008; Raich *et al.*, 2002). Based on this and the results obtained by the general linear model ($p \leq 0.05$), following Murcia and Ochoa (2008), who found that emissions are homogenous during the night in certain seasons of the year, the ideal daytime hours for CO₂ with the LI-COR 8100A flow chamber are 08:00, 10:00 h, 12:00 and 14:00 h, and good, although less convenient, are 16:00 and 18:00 h (Table 2), in two intervals every 30 and 120 min. Some daytime hours coincide with that established by Villanueva *et al.* (2014), who carried out for measurements per day every 6 h: 00:00, 06:00, 12:00 and 18:00 h in agroforestry plus livestock systems.

Davidson *et al.*, (2000) and Murcia and Ochoa (2008) found that the soil temperature is relatively constant during the night and presents no significant relation with CO₂ emissions. The relation between CO₂ emission and temperature is frequently described with an exponential function. Due to this, at a local level, variations in temperature and soil moisture explain the variation in CO₂ emissions in the short term (Villanueva *et al.*, 2014). The statistic values produced in our study suggest that rainfall did not influence CO₂ emissions directly.

Cuadro 2. Valores con probabilidad significativa de acuerdo con los horarios e intervalos de muestreo.
Table 2. Values with significant probability according to daytime hours and sampling intervals.

Hora	Cada 30 min	Cada 120 min	Hora	Cada 30 min	Cada 120 min
00:00	0.00 [†]	0.70	12:00	0.00	0.00
00:30	0.01		12:30	0.00	
01:00	0.05		13:00	0.00	
01:30	0.04		13:30	0.00	
02:00	0.32	0.22	14:00	0.01	0.01
02:30	0.10		14:30	0.20	
03:00	0.46		15:00	0.91	
03:30	0.34		15:30	0.07	
04:00	0.99	0.00	16:00	0.01	0.09
04:30	0.18		16:30	0.03	
05:00	0.04		17:00	0.20	
05:30	0.12		17:30	0.00	
06:00	0.19	0.31	18:00	0.00	0.09
06:30	0.10		18:30	0.00	
07:00	0.01		19:00	0.00	
07:30	0.00		19:30	0.00	
08:00	0.00	0.00	20:00	0.29	0.54
08:30	0.00		20:30	0.76	
09:00	0.00		21:00	0.95	
09:30	0.05		21:30	0.12	
10:00	0.00	0.01	22:00	0.15	0.61
10:30	0.04		22:30	0.00	
11:00	0.31		23:00	0.19	
11:30	0.00		23:30	0.00	

[†] El valor del coeficiente $p \leq 0.05$ en ambos intervalos indica horarios ideales para toma de muestras donde se presentaron diferencias significativas. ♦ The coefficient value $p \leq 0.05$ in both intervals indicates ideal daytime hours for sampling where significant differences were present.

y en la humedad del suelo explican la variación de las emisiones de CO₂ en el corto plazo (Villanueva *et al.*, 2014). Los estadísticos realizados en nuestro estudio sugieren que las precipitaciones no influyeron de manera directa en las emisiones de CO₂.

Con los resultados anteriores se ajustó un modelo para estimar las emisiones de CO₂ de acuerdo con la humedad del suelo y la temperatura ambiental en una zona cubierta con pasto. Como lo indicaron Murcia y Ochoa (2008) se puede utilizar para considerar las emisiones nocturnas:

$$CO_2 = -32.49 + 0.5080 \text{ Temperatura ambiental } (^\circ C) + 59.56 \text{ Humedad del suelo } (m^3 m^{-3})$$

The above results were used to adjust a model to estimate CO₂ emissions according to the soil moisture and environmental temperature in a grass-covered area. As stated by Murcia and Ochoa (2008), it can be used to consider night-time emissions:

$$CO_2 = -32.49 + 0.5080 \text{ Ambient Temperature } (^\circ C) + 59.56 \text{ Soil moisture } (m^3 m^{-3})$$

The significance of variables and statistics to test the suitability of the equation indicate that all assumptions were proven in a satisfactory manner (Table 3). Following our results and applying the model for grass-covered soil in the center of the

El carácter significativo de las variables y los estadísticos de prueba para la comprobación de la idoneidad de la ecuación, indica que todos los supuestos se cumplieron en forma satisfactoria (Cuadro 3). Al seguir nuestros resultados y aplicar el modelo para un suelo cubierto por pasto en el centro del país, temperatura media anual de 23.5 °C y humedad en el suelo de 0.47 m³ m⁻³, el resultado emitido es 7.44 μmol de CO₂ m⁻² s⁻¹. Como se observa, lo anterior no se aleja de los datos observados. Cantú *et al.* (2010) determinaron una respiración del suelo de 0.01 μmol m⁻² s⁻¹ con *Dichanthium annulatum*, a una temperatura ambiente de 36 °C y humedad del suelo de 0.22 m³ m⁻³, y al realizar una validación del modelo obtenido encontraron -1.1 μmol m⁻² s⁻¹; mientras que con temperatura de 30 °C y humedad de 0.37 m³ m⁻³ en suelos con *Leucaena* registraron 3 μmol m⁻² s⁻¹, y el modelo determina 4.79 μmol m⁻² s⁻¹.

Además, en un ecosistema de sabana a una temperatura media anual de 16.3 °C y humedad del suelo de 0.48 m³ m⁻³ la emisión fue 4.8 μmol m⁻² s⁻¹; bajo las mismas condiciones Tang y Baldocchi (2005) encontraron 1.8 μmol m⁻² s⁻¹. El modelo de regresión lineal presentó un error de ±2 μmol m⁻² s⁻¹. Es importante resaltar que el modelo determina 50% de la variación y el otro 50% se podría explicar por variables del desarrollo y morfo-fisiología de pasto, así como por las propiedades fisicoquímicas del suelo (Murcia y Ochoa, 2008). Además, otros factores como la biomasa radical, la actividad microbiana y la calidad del residuo vegetal (Wang *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

Un protocolo de cuantificación se elaboró para las emisiones de CO₂ desde el suelo, se puede replicar para diferentes usos y en particular fue efectivo en suelos cubiertos con pasto.

country, with an annual mean temperature of 23.5°C and soil moisture of 0.47 m³ m⁻³, the result is 7.44 μmol of CO₂ m⁻² s⁻¹. As observed, this is not far from the data observed. Cantú *et al.* (2010) determined a soil respiration rate of 0.01 μmol m⁻² s⁻¹ with *Dichanthium annulatum*, at an environmental temperature of 36 °C and a soil moisture of 0.22 m³ m⁻³, and after validating the model obtained, they found -1.1 μmol m⁻² s⁻¹. Meanwhile, with a temperature of 30 °C and a soil moisture of 0.37 m³ m⁻³ in soils with *Leucaena*, they registered 3 μmol m⁻² s⁻¹; the model establishes 4.79 μmol m⁻² s⁻¹.

Additionally, in a savannah ecosystem with a mean annual temperature of 16.3°C and a soil moisture of 0.48 m³ m⁻³, the emission was of 4.8 μmol m⁻² s⁻¹. Under the same conditions, Tang and Baldocchi (2005) found 1.8 μmol m⁻² s⁻¹. The linear regression model rendered an error of ±2 μmol m⁻² s⁻¹. It is important to highlight that the model determines 50% of the variation and the other 50% can be explained by other development and morpho-physiology variables of the grass, as well as by soil physicochemical properties (Murcia and Ochoa, 2008) and other factors such as the root biomass, microbial activity and the quality of the plant debris (Wang *et al.*, 2010).

CONCLUSIONS

A quantification protocol was created for CO₂ emissions from the soil, the protocol can be replicated for different uses and it was particularly effective on grass-covered soils.

The emissions recorded in intervals of 120 min were the best describing fluctuations during daytime.

The model protocol has the potential to be applied in the development of mitigation strategies and adaptation to climate change.

Cuadro 3. Validación del modelo de emisiones de CO₂ provenientes del suelo.
Table 3. Validation of the model for soil CO₂ emission.

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	-32.49	1.44	-22.62	0.000	
Temperatura ambiental	0.5080	0.0247	20.53	0.000	1.19
Humedad del suelo	59.56	2.34	25.48	0.000	1.19
		S	R ²	R ² (ajustado)	R ² (predicho)
		1.57669	51.34%	51.20%	50.90%

Las emisiones registradas en intervalos de 120 min describieron mejor la fluctuación durante el periodo diurno.

El protocolo modelo tiene potencial para aplicarse en el desarrollo de estrategias de mitigación y adaptación al cambio climático.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada en el “Programa de estancias posdoctorales vinculadas al fortalecimiento de la calidad del Posgrado Nacional 2018 (1).” A la Universidad Autónoma Chapingo (DGIP, CIRENAM y Departamento de Suelos) donde se realizó la investigación. A los revisores cuyos comentarios ayudaron a mejorar el manuscrito.

LITERATURA CITADA

- Abdalla, K., M. Mutema, P. Chivenge, C. Everson and V. Chplot, 2018. Grassland degradation significantly enhances soil CO₂ emission. *Catena* 167: 284–292.
- Bain, W. G., L. Hutrya, D. C. Patterson, A. V. Bright, B. C. Daube, J. W. Munger and S. C. Wofsy. 2005. Wind-induced error in the measurement of soil respiration using closed dynamic chambers. *Agric. For. Meteorol.* 131: 225–232.
- Bradford, J. and M. Ryan. 2008. Quantifying soil respiration at landscape scales. *In: Hoover, C. (ed). Field Measurements for Forest Carbon Monitoring.* Springer, Dordrecht. pp: 143–162.
- Cantú, I., H. González, and M. V. Gómez. 2010. CO₂ Efflux in Vertisol under different land use systems. *Trop. Subtrop. Agroecos.* 12: 389–403.
- Chi, Y., P. Yang, S. Ren, N. Ma, J. Yang, and Y. Xu, 2020. Effects of fertilizer types and water quality on carbon dioxide emissions from soil in wheat-maize rotations. *Sci. Total Environ.* 698: 1–9.
- Clough, T. J., P. Rochette, S. Thorams, M. Pihlatie, J. R. Christiansen, and R. E. Thorman. 2015. *In: Cecile de Klein, and M. Harvey (eds). Nitrous Oxide Chamber Methodology Guidelines Nitrous Oxide Chamber Methodology Guidelines.* 1.1. ed. New Zealand. pp: 146.
- Cueva, A., E. A. Yépez, J. Garatuza, C. J. Watts, y J. C. Rodríguez. 2012. Diseño y uso de un sistema portátil para medir la respiración de suelo en ecosistemas. *Terra Latinoam.* 30: 327–336.
- Davidson, E. A., K. Savage, L. Vercho, and R. Navarro. 2002. Minimizing artifacts and biases in chamber-based measurements of soil respiration. *Agric. For. Meteorol.* 113: 21–37.
- Davidson, E. A., L. V. Verchot, J. Henrique Cattáneo, I. L. Ackerman, and J. E. M. Carvalho. 2000. Effects of soil water content on soil respiration in forests and cattle pastures of eastern Amazonia. *Biogeochemistry* 48: 53–69.
- Dowhower, S. L., W. R. Teague, K. D. Casey, and R. Daniel, 2020. Soil greenhouse gas emissions as impacted by soil moisture and temperature under continuous and holistic planned grazing in native tallgrass prairie. *Agric. Ecosyst. Environ.* 287: 106647.
- Dunne, T., and L. B. Leopold. 1978. *Water in Environmental Planning.* Freeman, W. H. (ed). 818 p.
- Gómez, J., A. Monterroso, L. Lechuga, A. Arce. and P. Ruiz, 2017. Impact of climate change on soil organic carbon content on agricultural soils of Mexico, *In: Angelov, P., J. Iglesias, and J. Corrales (eds). Advances in Information and Communication Technologies for Adapting Agriculture to Climate Change.* pp: 58–69.
- Laurencena, M. I., M. S. Carponi, P. D. Reinoso, M. Butus, C. Scorciapino, M. Galli, y G. Pérez. 2009. Comportamiento de céspedes de *Cynodon dactylon* (L.) Pers. en Paraná, Entre Ríos, Argentina. *Ciencia, docencia y Tecnología.* pp: 129–141.
- Li, Z., J. Gao, L. Wen, C. Zou, C. Feng, D. Li, and D. Xu. 2019. Dynamics of soil respiration in alpine wetland meadows exposed to different levels of degradation in the Qinghai-Tibet Plateau, China. *Sci. Rep.* 9: 1–14.
- LI-COR Biosciences. 2015. Using the LI-8100A soil gas flux system. 232 p.
- Mishra, U., R. Lal, B. Slater, F. Calhoun, D. Liu, and M. Van Meirvenne. 2009. Predicting soil organic carbon stock using profile depth distribution functions and ordinary kriging. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 73: 614.
- Murcia, M., y M. Ochoa, 2012. Respiración del suelo y caída de hojarasca en el matorral del bosque altoandino (Cuenca del Río Pamplonita, Colombia). *Caldasia* 34: 165–185.
- Murcia, M., y M. Ochoa. 2008. Respiración del suelo en una comunidad sucesional de pastizal del bosque Altoandino en la cuenca del Río Pamplonita, Colombia. *Caldasia* 30: 337–353.
- Parkin, T. and R. Venterea. 2010. Chamber-based trace gas flux measurements. *In: Follet, R. (ed.) IN Sampling Protocols.* pp: 1 – 39. https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/np212/Chapter_3_GRACEnet_Trace_Gas_Sampling_Protocols.pdf. (Consulta: mayo 2019).
- Pompa, M., and J. Sigala, 2017. Variation of carbon uptake from forest species in Mexico: a review. *Madera y Bosques* 23: 225–235.
- Raich, J. W., C. Potter, and D. Bhagawati. 2002. Interannual variability in global soil respiration, 1980 - 94. *Glob. Change Biol.* 8: 800–812.
- Ru, J., Y. Zhou, D. Hui, M. Zheng, and S. Wan, 2018. Shifts of growing-season precipitation peaks decrease soil respiration in a semiarid grassland. *Glob. Chang. Biol.* 24: 1001–1011.
- Ryan, E. M., K. Ogle, H. Kropp, K. E. Samuels-Crow, Y. Carrillo, and E. Pendall. 2018. Modeling soil CO₂ production and transport with dynamic source and diffusion terms: Testing the steady-state assumption using DETECT v1.0. *Geosci. Model Dev.* 11: 1909–1928.
- Serran, E. Z., M. Nuñez, y E. Valleter, 2017. Respiración de dióxido de carbono de suelo, en bosque tropical húmedo – Gamboa Panamá Carbon. *I+D Tecnológico.* 13: 49–54.
- Singh, B.P., V. de Rémy de Courcelles, and M.A. Adams, 2011. Soil Respiration in Future Global Change Scenarios. *In: Singh, B. P., A. L. Cowie, and K. Y. Chan. (eds). Soil Health and Climate Change.* Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 131–153.
- Tang, J., and D. D. Baldocchi. 2005. Spatial-temporal variation

- in soil respiration in an oak-grass savanna ecosystem in California and its partitioning into autotrophic and heterotrophic components. *Biogeochemistry* 73: 183–207.
- Tiruvaimozhi, Y. V. and M. Sankaran. 2019. Soil respiration in a tropical montane grassland ecosystem is largely heterotroph-driven and increases under simulated warming. *Agric. For. Meteorol.* 276–277: 107619.
- Villanueva, G., F. Casanova, L. Ramírez y P. Martínez. 2014. Influencia del sistema silvopastoril “cercas vivas” de *Gliricidia sepium* en la respiración del suelo en Tacotalpa, Tabasco, México. *Trop. Subtrop. Agroecosystems* 17: 261–266.

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE INHIBIDORES DE PAPAÍNA PROVENIENTES DE SEMILLAS DE AMARANTO (*Amaranthus caudatus*) Y FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PAPAINE INHIBITORS FROM AMARANTO (*Amaranthus caudatus*) AND FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) SEEDS

Tannya Elizabeth Ruiz-Tapia¹, Gonzalo Rafael Jácome-Camacho¹, Marco Vinicio Sinche-Serra¹,
Juan Patricio Castillo-Domínguez^{1*}, Francesc Xavier Avilés-Puigvert², Martha Hernández-de la Torre³

¹Escuela Politécnica Nacional, Laboratorio de Investigaciones Aplicadas, Ladrón de Guevara E11-253, P.O. Box 17-01-2759, Quito, Ecuador. (patricio.castillo@epn.edu.ec). ²Universidad Autónoma de Barcelona, Unidad de Ingeniería de Proteínas y Proteómica, 08193 Bellaterra, Barcelona, España. (FrancescXavier.Aviles@uab.cat). ³Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Victoria 631, Barrio Universitario, Casilla 160-C-Correo 3. Concepción, Chile. (marhernandez@udec.cl).

RESUMEN

Los inhibidores de proteasas vegetales con frecuencia son proteínas de baja masa molar, presentes en tejidos de almacenamiento y aéreos de las plantas. Su expresión se induce en respuesta al daño por insectos y microorganismos patógenos y el contenido de estos inhibidores puede ser alto en órganos de cereales y leguminosas. Bajo la premisa de que la combinación de técnicas de purificación de proteínas de baja y alta resolución permite incrementar la actividad específica de inhibidores de proteasas presentes en tejidos vegetales, el objetivo de este estudio fue aislar, purificar y caracterizar bioquímicamente inhibidores de papaína a partir de semillas de amaranto (*Amaranthus caudatus*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*). El diseño experimental fue completamente al azar para seleccionar las técnicas de baja resolución que incrementan significativamente ($p \leq 0.05$) el grado de purificación de los extractos tratados. En todos los estudios se hicieron tres repeticiones y las mediciones se realizaron por triplicado. A partir de harinas de semillas de amaranto y frijol se obtuvieron extractos proteicos crudos que después se ultrafiltraron en membranas de 10 kDa. Las fracciones de baja masa molar se purificaron por cromatografía de afinidad en papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL. El extracto crudo de amaranto presentó actividad inhibitoria de 1.177 ± 0.067 mU mL⁻¹ y el de frijol 1.556 ± 0.542 mU·mL⁻¹. Los extractos con purificación parcial de amaranto y frijol se purificaron por cromatografía de afinidad en papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL, hasta 137.5 y 79.1 veces, respectivamente. La

ABSTRACT

Plant protease inhibitors are often low molar mass proteins and are present in plant storage and aerial tissues. Their expression is induced in response to damage by insects and pathogenic microorganisms, and the content of these inhibitors can be high in cereal and legume organs. Under the premise that the combination of low and high resolution protein purification techniques allows increasing the specific activity of protease inhibitors present in plant tissues, the objective of this study was to isolate, purify, and biochemically characterize papain inhibitors from amaranth (*Amaranthus caudatus*) and bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. Completely randomized experimental designs were used to select low resolution techniques that significantly increase ($p \leq 0.05$) the purification degree of the treated extracts. In all studies, three replicates were made, and measurements were performed in triplicate. Crude protein extracts were obtained from amaranth and bean seed flours, which were then ultrafiltered in 10 kDa membranes. Low molar mass fractions were purified by affinity chromatography in papain-glyoxyl-sepharose 6B-CL. The crude amaranth extract presented inhibitory activity of 1.177 ± 0.067 mU mL⁻¹, and the bean extract presented an inhibitory activity of 1.556 ± 0.542 mU·mL⁻¹. The amaranth and bean extracts with partial purification were purified by affinity chromatography in papain-glioxyl-sepharose 6B-CL, up to 137.5 and 79.1 times, respectively. The estimated molar mass was 7.50 kDa for the amaranth inhibitor, and 8.20 kDa for the bean inhibitor. The amaranth inhibitor showed competitive inhibition with $0.872 \mu\text{M}$ K_i , while the bean inhibitor was non-competitive with $0.058 \mu\text{M}$ K_i . This demonstrates the presence of cysteine protease inhibitors in amaranth and bean seeds.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: julio, 2019. Aprobado: marzo, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 747-761. 2020.

masa molar estimada fue 7.50 kDa para el inhibidor de amaranto y 8.20 kDa para el de frijol. El inhibidor de amaranto mostró inhibición competitiva con K_i de $0.872 \mu\text{M}$, mientras que la del frijol fue no competitiva y con K_i de $0.058 \mu\text{M}$. Esto evidencia la presencia de inhibidores de cisteíno proteasas en las semillas de amaranto y frijol.

Palabras clave: *Amaranthus caudatus*, *Phaseolus vulgaris*, cromatografía de afinidad, inhibidores proteicos, cisteíno proteasas, papaína.

INTRODUCCIÓN

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos en una secuencia dada de aminoácidos. Según el grupo catalítico del sitio activo y su mecanismo de catálisis, se clasifican en cinco grupos: serino, cisteíno, metalo, aspartato y glutamato proteasas (Lecaille *et al.*, 2012; Siklos *et al.*, 2015). Las serino y cisteíno proteasas se han estudiado desde hace varias décadas porque participan en procesos de propagación de enfermedades y sus inhibidores se reconocen como alternativas terapéuticas para el tratamiento del cáncer, malaria, hepatitis, herpes, infecciones parasitarias, y Alzheimer (Rosenberg *et al.*, 2014; Lencastre *et al.*, 2015; Del Moral *et al.*, 2015; Hellinger and Gruber, 2019).

Los inhibidores de proteasas (IPs) de naturaleza proteínica tienen masas molares bajas y regulan la actividad de las enzimas proteolíticas. Los IPs pueden formar complejos estables con proteasas blanco de procesos patogénicos, para bloquear, alterar o evitar el acceso al centro activo de la enzima. Estas biomoléculas tienen distribución amplia en la naturaleza, en especial en leguminosas, cereales, tubérculos y algunas frutas (Laskowski *et al.*, 2003; Molesini *et al.*, 2017).

Las semillas de ciertos cereales y leguminosas tienen un alto contenido proteínico que se acumula en la fase de desarrollo de la semilla (Cruz *et al.*, 2013) e incluye enzimas, lectinas e inhibidores de proteasas (Wong *et al.*, 2010). A partir de tejidos de papa (*Solanum tuberosum*), aguacate (*Persea americana*), zanahoria (*Daucus carota*), trigo (*Triticum spp*), maíz (*Zea mays*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), otros cereales y leguminosas, se han aislado y caracterizado inhibidores de cisteíno proteasas de tipo cistatinas (Liang *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 2003; Gruber *et al.*, 2007; Kaur and Sohal, 2016; Szewinska *et al.*, 2016).

Key words: *Amaranthus caudatus*, *Phaseolus vulgaris*, affinity chromatography, protein inhibitors, cysteine proteases, papain.

INTRODUCTION

Proteases are enzymes that catalyze the hydrolysis of peptide bonds in a given amino acid sequence. According to the catalytic group of the active site, and its catalysis mechanism, they are classified into five groups: serine, cysteine, metallo, aspartate and glutamate proteases (Lecaille *et al.*, 2012; Siklos *et al.*, 2015). Serine and cysteine proteases were studied for several decades because they participate in disease propagation processes, and their inhibitors are recognized as therapeutic alternatives for the treatment of cancer, malaria, hepatitis, herpes, parasitic infections, and Alzheimer's disease (Rosenberg *et al.*, 2014; Lencastre *et al.*, 2015; Del Moral *et al.*, 2015; Hellinger and Gruber, 2019). Protease inhibitors (IPs) of proteinic nature have low molar masses and regulate the activity of proteolytic enzymes. IPs can form stable complexes with proteases that are targets of pathogenic processes, to block, alter or prevent access to the enzyme's active center. These biomolecules are widely distributed in nature, especially in legumes, cereals, tubers, and some fruits (Laskowski *et al.*, 2003; Molesini *et al.*, 2017).

The seeds of certain cereals and legumes have a high protein content that accumulates in the development phase of the seed (Cruz *et al.*, 2013), and includes enzymes, lectins, and protease inhibitors (Wong *et al.*, 2010). Cystatin-type cysteine protease inhibitors were isolated and characterized from tissues of potato (*Solanum tuberosum*), avocado (*Persea americana*), carrot (*Daucus carota*), wheat (*Triticum spp*), corn (*Zea mays*), sugarcane (*Saccharum officinarum*), other cereals, and legumes (Liang *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 2003; Gruber *et al.*, 2007; Kaur and Sohal, 2016; Szewinska *et al.*, 2016).

Plant protease inhibitors have a major role in endogenous defense systems; they regulate the balance of proteolytic activity and participate in exogenous defense. Also, their expression is induced in response to damage, caused by insects and pathogenic microorganisms (Haq *et al.*, 2004). The applications of IPs for food and therapeutic purposes are very varied and are studied for their bioinsecticide activity. *In vitro* studies indicate that these genes could be used in the control of devastating pests of crops

Los inhibidores de proteasas de plantas tienen una función primordial en los sistemas de defensa endógenos, regulan el balance de la actividad proteolítica y participan en la defensa exógena. Además, su expresión se induce en respuesta al daño causado por insectos y microorganismos patógenos (Haq *et al.*, 2004). Las aplicaciones de los IPs con fines alimenticios y terapéuticos son muy variadas y se estudian por su actividad bioinsecticida. Estudios *in vitro* indican que estos genes podrían utilizarse en el control de plagas devastadoras de cultivos de importancia agrícola (Kaur and Sohal, 2016; Samiksha *et al.*, 2019). También, su actividad reguladora inhibe hongos patógenos que causan enfermedades en cultivo de importancia económica (Eprintseva *et al.*, 2015). El amplio espectro de uso de estas moléculas en la salud, la biotecnología, la alimentación y la agricultura despertó el interés de la comunidad científica en varios países, y se propone aislar nuevos IPs de amplio espectro de uso para autoabastecer mercados locales y sustituir importaciones (Jamal *et al.*, 2013).

Los IPs deben ser potentes y selectivos en la unión a una proteasa particular para considerarse herramientas biológicas eficaces. La purificación es por el uso combinado de técnicas separativas que permitan eliminar las proteínas no deseadas presentes en los extractos acuosos mediante el aprovechamiento de sus propiedades físicas y químicas, pero sin alterar su actividad biológica. Entre los métodos de purificación, la cromatografía de afinidad aprovecha la capacidad de unión específica de los IPs a las enzimas que inhiben (Oliveira *et al.*, 2007).

En este estudio se diseñó un procedimiento integral para detectar, aislar, purificar y caracterizar bioquímicamente inhibidores de papaína a partir de extractos proteínicos de semillas de amaranto (*Amaranthus caudatus*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*), a través de un sistema que emplea cromatografía de afinidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos químicos

Para la investigación se utilizaron reactivos Sigma Aldrich (EUA): acetato de para-nitrofenilo (p-NPA), borohidruro de sodio, sepharosa 6B-CL y L-cisteína; Fluka Chemie (Suiza): papaína; BDH Laboratory (Inglaterra): 1-propanol; y Promega (EUA): sulfato de amonio.

with agricultural importance (Kaur and Sohal, 2016; Samiksha *et al.*, 2019). Moreover, their regulatory activity inhibits pathogenic fungi that cause disease in economically important crops (Eprintseva *et al.*, 2015). The wide use spectrum of these molecules in health, biotechnology, food and agriculture has raised the interest of the scientific community in several countries, and it is proposed to isolate new broad-spectrum IPs for self-supplying local markets and import substitution (Jamal *et al.*, 2013).

IPs must be powerful and selective in binding to a particular protease to be considered effective biological tools. Purification is given by the combined use of separation techniques that allow the removal of unwanted proteins, present in the aqueous extracts, by exploiting their physical and chemical properties, but without altering their biological activity. Among the purification methods, affinity chromatography takes advantage of the specific binding capacity of IPs to the enzymes they inhibit (Oliveira *et al.*, 2007).

In this study, a comprehensive procedure was designed to detect, isolate, purify and biochemically characterize papain inhibitors from protein extracts of amaranth (*Amaranthus caudatus*) and bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds, through a system using affinity chromatography.

MATERIALS AND METHODS

Chemical reagents

For this research, the following reagents were used: para-nitrophenyl acetate (p-NPA), sodium borohydride, sepharose 6B-CL, and L-cysteine from Sigma Aldrich (USA); papain from Fluka Chemie (Switzerland); 1-propanol from BDH Laboratory (England); and ammonium sulfate from Promega (USA).

Plant material

The bean and amaranth varieties evaluated were I-481-Rojo del Valle, and I Alegria, produced and certified by the National Autonomous Institute of Agricultural Research of Ecuador.

Obtaining of protein extracts

Amaranth and bean seeds (25 g) were ground to a fine flour (particle size ≤ 1 mm), and pre-degreased with 1-propanol (Promega, USA) in a 1:4 ratio (solid: liquid), according to

Material vegetal

Las variedades de frijol y amaranto evaluadas fueron I-481-Rojo del valle e I-Alegría, producidas y certificadas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador.

Obtención de extractos proteicos

Las semillas de amaranto y frijol (25 g) se molieron hasta obtener una harina fina (tamaño de partícula ≤ 1 mm) y un desengrasado previo con 1-propanol (Promega, EUA) en una relación 1:4 (sólido: líquido), según el método desarrollado en la Planta Piloto del Instituto de Investigación Tecnológica de la Escuela Politécnica Nacional (1999). Para la preparación de extractos proteicos se utilizó el procedimiento desarrollado en el Laboratorio de Investigaciones Aplicadas de la Escuela Politécnica Nacional (2011) a partir de experiencias en la extracción de inhibidores marinos descritos por Delfin *et al.* (1994) y la fundamentación teórica correspondiente (Chávez *et al.*, 1990), con modificaciones. Las harinas se suspendieron y agitaron, por separado, con amortiguador fosfato 50 mM, pH 6 (relación 1:5), se utilizó fosfato monobásico de sodio (Sigma- Aldrich, EUA). La suspensión obtenida se centrifugó 30 min a $835 \times g$, y el sobrenadante se ultrafiltró en membranas de 50 kDa. En los extractos crudos, que correspondieron a las fracciones con masas molares menores a 50 kDa, se determinó la actividad inhibidora (AI) sobre papaína. La concentración de proteínas [P] se estimó con la medición de la absorbancia a 280 nm, en un espectrofotómetro Hitachi UV-Visible, modelo U-1900 (Japón).

Determinación de actividad inhibidora sobre papaína

La actividad enzimática de papaína se determinó con acetato frente al sustrato para-nitrofenilo (p-NPA), suministrado por Sigma-Aldrich (EUA). En una cubeta de cuarzo se mezclaron 2000 μL de amortiguador fosfato 50 mM, pH 6, que contenía EDTA 50 mM (grado analítico, Loba Chemie, India) y L-cisteína 20 mM (Sigma-Aldrich, EUA); 200 μL de la solución de papaína (7 mg mL^{-1} en amortiguador fosfato 50 mM, pH 6.0), procedente de Fluka Chemie (Suiza); y 200 μL de p-NPA (8 mg mL^{-1}). Para los estudios de inhibición se sustituyeron 600 μL del amortiguador por extracto inhibidor, se añadieron a 200 μL de papaína y después 200 μL de p-NPA. En ambos casos se midió la absorbancia a 348 nm, cada 15 s durante 3 min. La AI se calculó como la diferencia entre la actividad enzimática sin inhibidor y la medida en presencia del mismo y se expresó en mU mL^{-1} de extracto acuoso. La unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de papaína necesaria para hidrolizar 1 mmol de p-NPA en las condiciones de ensayo (Earlanger *et al.*, 1961).

the method developed in the Pilot Plant at the Instituto de Investigación Tecnológica under the Escuela Politécnica Nacional (1999). For the preparation of protein extracts, the procedure developed at Laboratorio de Investigaciones Aplicadas under the Escuela Politécnica Nacional (2011) was applied, based on experiences in the extraction of marine inhibitors described by Delfin *et al.* (1994), and the corresponding theoretical foundation (Chávez *et al.*, 1990), with modifications. Flours were suspended and stirred, separately, with phosphate buffer 50 mM, pH 6 (1:5 ratio); monobasic sodium phosphate (Sigma- Aldrich, USA) was used. The resulting suspension was centrifuged for 30 min at $835 \times g$, and the supernatant was ultrafiltered in 50 kDa membranes. In the crude extracts, which corresponded to the fractions with molar masses lower than 50 kDa, the inhibitory activity (AI) on papain was determined. The protein concentration [P] was estimated by measuring the absorbance at 280 nm, in a Hitachi UV-Visible spectrophotometer, model U-1900 (Japan).

Determination of inhibitory activity on papain

The enzymatic activity of papain was determined against para-nitrophenyl acetate (p-NPA), as substrate, supplied by Sigma-Aldrich (USA). In a quartz cuvette, 2000 μL of 50 mM phosphate buffer, pH 6.0, containing 50 mM EDTA (analytical grade, Loba Chemie, India) and 20 mM L-cysteine (Sigma-Aldrich, USA); 200 μL of the papain solution (7 mg mL^{-1} in 50 mM phosphate buffer, pH 6.0), supplied by Fluka Chemie (Switzerland); and 200 μL of p-NPA (8 mg mL^{-1}), were mixed. For the inhibition studies, 600 μL of the buffer were replaced with inhibitor extract, added to 200 μL of papain, and then 200 μL of p-NPA. In both cases, absorbance was measured at 348 nm, every 15 s for 3 min. AI was calculated as the difference between the enzyme activity without inhibitor and the one measured in the presence of the inhibitor, and was expressed in mU mL^{-1} of aqueous extract. The enzyme activity unit (U) was defined as the amount of papain needed to hydrolyze 1 mmol of p-NPA under the test conditions (Earlanger *et al.*, 1961).

With the values of protein concentration and AI, the specific inhibitory activity (AIE) was determined as the ratio of AI to the protein concentration of each sample. In all stages, the degree of purification (GP) was determined.

Partial purification of amaranth and bean protein extracts

Completely randomized designs were used to select the partial purification techniques for each type of crude extract. There were three purification processes: 1) a heat treatment at 60 °C, for 30 min, and centrifugation for 45 min at $2800 \times g$ (WIFUG centrifuge, model 2 000 E, England); 2) the extracts were ultrafiltered in AMICON (Sigma-Aldrich, USA)

Con los valores de concentración de proteínas y AI se determinó la actividad inhibidora específica (AIE), como la relación de la AI sobre la concentración de proteína de cada muestra. En todas las etapas se determinó el grado de purificación (GP).

Purificación parcial de extractos proteicos de amaranto y frijol

Para seleccionar las técnicas de purificación parcial de cada tipo de extracto crudo se utilizaron diseños completamente al azar. Los procesos de purificación fueron tres: 1) un tratamiento calórico a 60 °C, por 30 min, y centrifugación por 45 min a $2800 \times g$ (centrífuga WIFUG, modelo 2 000 E, Inglaterra); 2) los extractos se ultrafiltraron en equipo de ultrafiltración AMICON (Sigma-Aldrich, EUA) y se usaron membranas de 10 kDa; 3) una precipitación (entre 30 y 60% de saturación) con sulfato de amonio (Promega, EUA), en la que el precipitado, suspendido en un mínimo volumen de tampón fosfato, se centrifugó en las condiciones antes indicadas y se desalinizó en tubos Millipore AMICON Ultra, para ultrafiltración. Las técnicas que no aumentaron (Tukey, $p \leq 0.05$) la actividad inhibidora específica con respecto a los extractos crudos, se descartaron. Los extractos semipurificados mediante las técnicas seleccionadas, aplicadas de forma consecutiva, pasaron a la etapa de purificación selectiva.

Purificación selectiva de los inhibidores de papaína por cromatografía de afinidad

La purificación se desarrolló en un sistema de cromatografía, Pharmacia, modelo LKB – FRAC 100 (Suecia). El soporte de glioxil-sepharosa 6B-CL (Sigma-Aldrich, EUA) se preparó según Guisán *et al.* (1988) y se suspendió en solución amortiguadora borato 0.1 M, pH 8.0 (ácido bórico, grado analítico, procedente de Riedel-de-Haën; Alemania). Luego se añadieron 12 mg de papaína mL^{-1} de soporte y el sistema estuvo 2 h en agitación magnética a 4 °C. Para una reducción química de la matriz papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL, se añadieron 5 mg de borohidruro de sodio (Sigma-Aldrich, EUA) por cada mL de soporte (Cutíño *et al.*, 2014).

El soporte de papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL se empacó en una columna de vidrio y se equilibró con amortiguador fosfato 50 mM, pH 6.0. Luego, cada extracto semipurificado se aplicó a esta columna de afinidad. Una elución ácida se realizó con KCl-HCl, 1 M (cloruro de potasio, Merck, y ácido clorhídrico, 37% de pureza (J. T. Baker) ambos de grado analítico, Alemania). La velocidad de flujo fue $0.50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ y se recolectaron fracciones de 3 mL. En cada fracción se determinó la concentración de proteínas y la AI sobre papaína. Las fracciones con mayor AI sobre papaína, de cada extracto, se agruparon en lotes por separado para su respectiva caracterización bioquímica.

ultrafiltration equipment, and 10 kDa membranes were used; 3) a precipitation (between 30 and 60% saturation) with ammonium sulfate (Promega, USA), in which the precipitate, suspended in a minimum volume of phosphate buffer, was centrifuged under the conditions indicated above and desalted in Millipore AMICON Ultra tubes for ultrafiltration. The techniques that did not increase (Tukey, $p \leq 0.05$) the specific inhibitory activity with respect to the crude extract were discarded. The semi-purified extracts by means of the selected techniques applied in a consecutive way, went to the selective purification stage.

Selective purification of papain inhibitors by affinity chromatography

The purification was developed in a Pharmacia chromatography system, model LKB - FRAC 100 (Sweden). The glyoxyl-sepharose support 6B-CL (Sigma-Aldrich, USA) was prepared according to Guisán *et al.* (1988), and was suspended in 0.1 M borate buffer solution, pH 8.0 (boric acid, analytical grade, from Riedel-de-Haën, Germany). Then, 12 mg mL^{-1} of papain were added as support, and the system was subjected to magnetic agitation for 2 h at 4 °C. For a chemical reduction of the papain-glyoxyl-sepharose 6B-CL matrix, 5 mg of sodium borohydride (Sigma-Aldrich, USA) were added for each mL of support (Cutíño *et al.*, 2014).

The papain-glyoxyl-sepharose 6B-CL support was packed in a glass column, and equilibrated with 50 mM phosphate buffer, pH 6.0. Each semi-purified extract was then loaded to the mentioned affinity column. An acid elution was carried out with KCl-HCl, 1 M (potassium chloride from Merck and hydrochloric acid from J. T. Baker, 37% purity; both analytical grade, Germany). The flow rate was $0.50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, and fractions of 3 mL were collected. In each fraction, the concentration of proteins and AI on papain were determined. The fractions with higher AI on papain, from each extract, were grouped in separate pools for their respective biochemical characterization.

Analysis of the fractions purified by SDS-PAGE

Pools B (amaranth) and E (bean) (Figures 1 and 2), which showed higher papain inhibition, were analyzed by electrophoresis (SDS-PAGE)

in polyacrylamide gels (Electrophoresis-grade acrylamide and bisacrylamide, Bio-Rad, USA) and sodium dodecyl sulfate (electrophoresis grade, Sigma-Aldrich, USA), with a 5% concentrator gel, and a 16% acrylamide resolution gel, at room temperature, and under reducing conditions with β mercaptoethanol (electrophoresis grade, Merck, Germany), in the presence of Bromophenol Brilliant Blue (electrophoresis grade, Sigma-Aldrich, USA), according to the modified Laemmli

Análisis de las fracciones purificadas por SDS-PAGE

Los lotes B (amaranto) y E (frijol) (Figuras 1 y 2), que presentaron mayor inhibición de papaína, se analizaron mediante electroforesis (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida (Acrilamida y Bisacrilamida grado electroforesis, Bio-Rad, EUA) y dodecil sulfato de sodio (grado electroforesis, Sigma-Aldrich, EUA), con un gel concentrador al 5% y un gel de resolución al 16% de acrilamida, a temperatura ambiente y en condiciones reductoras con β -mercaptoetanol (grado electroforesis, Merck, Alemania), de acuerdo con el método de Laemmli modificado (Laemmli, 1970; Schagger y Von Jagow, 1987). La tinción de los geles se realizó con Coomassie (Azul brillante de Coomassie, grado electroforesis, Merck, Alemania; y Azul brillante de bromofenol, grado electroforesis, Sigma-Aldrich, EUA). Para la electroforesis se utilizaron cámaras y fuentes provenientes de Thermo Electron Corporation, EC 250-90 (EUA).

Caracterización cinética de los inhibidores de papaína

Para determinar el tipo de inhibición de los inhibidores provenientes de amaranto y frijol se midió la actividad enzimática de papaína en presencia y ausencia de extractos inhibidores a diferentes concentraciones de sustrato (p-NPA, entre 3 y 12 mg mL⁻¹).

method (Laemmli, 1970; Schagger and Von Jagow, 1987). The gels staining was made with Coomassie solution (Coomassie Brilliant Blue, electrophoresis grade, Merck, Germany). Chambers and power supplies from Thermo Electron Corporation, EC 250-90 (USA) were used for the electrophoresis.

Kinetic characterization of papain inhibitors

To determine the inhibition type of the inhibitors coming from amaranth and bean, the enzymatic activity of papain was measured in the presence and absence of inhibiting extracts at different concentrations of substrate (p-NPA, between 3 and 12 mg mL⁻¹).

The Michaelis-Menten constant (Km), the maximum speed (Vmax), and the inhibition constant (Ki) (Nelson and Cox, 2013) were calculated.

Statistical analysis

This analysis was carried out with Statgraphics Centurion XVII.II software (StatPoint Technologies, Inc.). The t-Student test was used for the comparisons of two samples. Data from the purification techniques were analyzed with unifactorial ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). The results of the statistical analysis are shown in the tables.

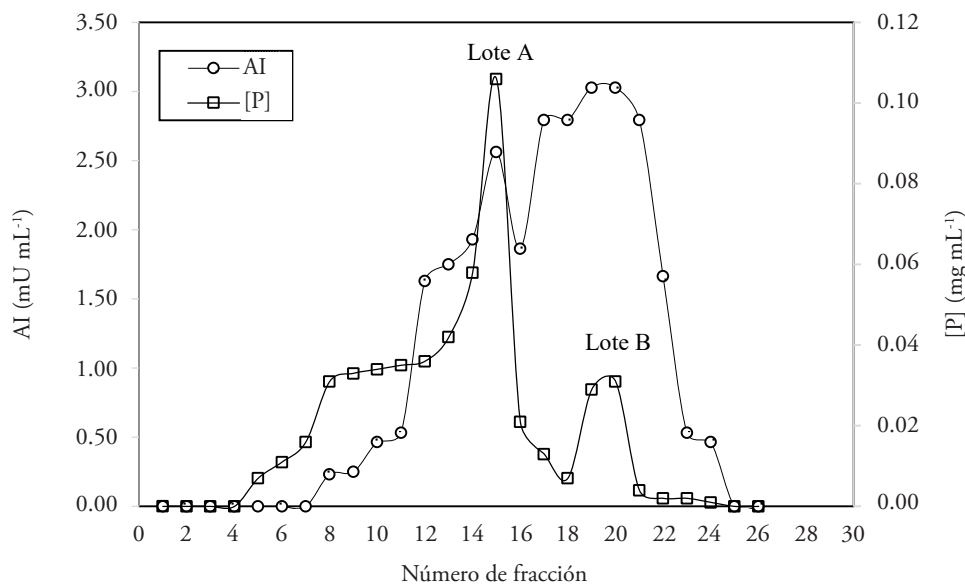


Figura 1. Perfil de elución de cromatografía en papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL para inhibidores provenientes de semillas de amaranto.

Figure 1. Chromatography elution profile in papain-glyoxyl-sepharose 6B-CL for inhibitors from amaranth seeds.

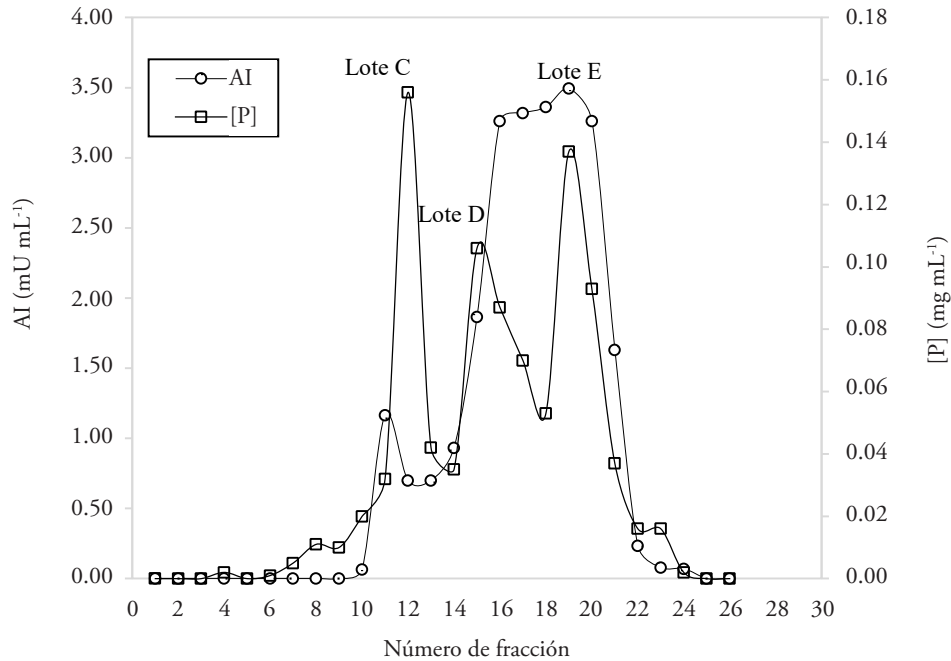


Figura 2. Perfil de elución de cromatografía en papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL para inhibidores provenientes de semillas de frijol.

Figure 2. Chromatography elution profile in papain-glyoxyl-sepharose 6B-CL for inhibitors from bean seeds.

La constante de Michaelis-Menten (K_m), la velocidad máxima ($V_{máx}$) y la constante de inhibición (K_i) (Nelson y Cox, 2013) se calcularon.

Análisis estadístico

Este análisis se efectuó con el software Statgraphics Centurion XVII.II (StatPoint Technologies, Inc.). La prueba t-Student se utilizó para las comparaciones de dos muestras. Los datos de las técnicas de purificación se analizaron con ANDEVA unifactorial y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los resultados del análisis estadístico están en los cuadros.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inhibición de papaína con los extractos crudos

El preparado obtenido a partir de frijol presentó una concentración mayor de proteínas que el de amaranto (Cuadro 1).

La actividad enzimática de papaína fue 3.961 ± 0.216 mU mL⁻¹. El extracto crudo de amaranto presentó una inhibición de 29% y el de frijol 39%. La actividad inhibitora específica del extracto crudo de

RESULTS AND DISCUSSION

Papain inhibition with crude extracts

The preparation obtained from bean had a higher concentration of proteins than the amaranth one (Table 1).

The enzymatic activity of papain was 3.961 ± 0.216 mU mL⁻¹. Crude amaranth extract showed an inhibition of 29%, and bean extract 39%. Specific inhibitory activity of crude amaranth extract was 0.297 ± 0.072 mU mg⁻¹, and 0.259 ± 0.115 mU mg⁻¹ for the bean extract.

Hellinger and Gruber (2019) reported the presence of cysteine protease inhibitors in seeds of angiosperms and gymnosperms families. Papain inhibitors were isolated from seeds of grasses, legumes, and some cereals; they also were found in other plant tissues, although in lower concentrations (Hines *et al.*, 1992; Valdés-Rodríguez *et al.*, 1993; Oliveira *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2015).

Hernández *et al.* (2014) investigated protease inhibition with protein extracts from Latin American seeds and found inhibition on papain by bean

Cuadro 1. Concentración de proteínas y actividad inhibidora de los extractos crudos de amaranto y frijol.**Table 1. Protein concentration and inhibitory activity of amaranth and bean crude extracts.**

Extracto crudo	Concentración de proteínas (mg mL ⁻¹)	Actividad inhibidora (mU mL ⁻¹)
Amaranto	4.14 ± 1.09 a	1.177 ± 0.057 a
Frijol	7.54 ± 1.47 b	1.556 ± 0.542 a

$\bar{X} \pm \sigma$ (n=3).

Medias con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (t-Student; p≤0.05).

♦ Means with different letter in columns are statistically different (t-Student; p≤0.05).

amaranto fue 0.297±0.072 mU mg⁻¹ y la del de frijol 0.259±0.115 mU mg⁻¹.

Hellinger and Gruber (2019) reportaron la presencia de inhibidores de cisteíno proteasas en semillas de familias de angiospermas y gimnospermas. Inhibidores de papaína se aislaron de semillas de gramíneas, leguminosas y algunos cereales; también se han encontrado en otros tejidos vegetales, aunque en concentraciones menores (Hines *et al.*, 1992; Valdés-Rodríguez *et al.*, 1993; Oliveira *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2015).

Hernández *et al.* (2014) investigaron la inhibición de proteasas con extractos proteicos de semillas latinoamericanas y encontraron inhibición sobre papaína por los extractos de frijol (11.8±3.5 mU mg⁻¹ proteínas) y de amaranto (9.2±1.3 mU mg⁻¹ proteínas). En esos estudios se utilizaron las mismas harinas de amaranto y frijol y la AIE detectada fue mayor; estas diferencias se justifican porque en las pruebas enzimáticas se usó otra metodología: sustrato L-piroglutamil-L-fenilalanil-L-leucinil-p-nitroanilida y microtécnicas para la detección de nuevos IPs.

Purificación parcial de los extractos crudos

La ultrafiltración permitió separar las proteínas de altas masas molares y refinar el extracto crudo obtenido de semillas de amaranto (Cuadro 2).

La disminución del grado de purificación ocasionada por el tratamiento calórico muestra la labilidad térmica de las moléculas proteicas de interés en el extracto y la no conveniencia de su aplicación. El mayor grado de pureza se alcanzó al precipitar los extractos proteicos de amaranto con sulfato de amonio.

extracts (11.8±3.5 mU mg⁻¹ protein), and amaranth (9.2±1.3 mU mg⁻¹ protein). In those studies, the same amaranth and bean flours were used and the AIE detected was higher. These differences are justified since, in the enzymatic tests, another methodology was used: L-piroglutamyl-L-phenylalanil-L-leucinil-p-nitroanilide as substrate, and microtechniques for the detection of new IPs.

Partial purification of crude extracts

Ultrafiltration allowed to separate the proteins of high molar masses and to refine the crude extract obtained from amaranth seeds (Table 2).

The decrease in the purification degree, caused by the heat treatment, shows the thermal lability of the protein molecules of interest in the extract and the unsuitability of its application. The highest degree of purity was achieved by precipitating the amaranth protein extracts with ammonium sulfate. During this purification process, there was a global loss of 73% of proteins.

Heat treatment allowed denaturing proteins in the extracts and increasing the degree of purity in the crude extracts, obtained from bean seeds (Table 3). The most efficient partial purification stage for the bean extract was the ultrafiltration with a 10 kDa membrane, in which the highest degree of purity was reached in the permeate. Around 47% of the total amount of proteins decreased after these two processing stages. The semi-purified bean extract completely lost the AI during the differentiated precipitation with ammonium sulfate, due to the denaturalization of the proteins of interest, which

Cuadro 2. Rendimientos en la purificación parcial del extracto de amaranto.**Table 2. Performance in the partial purification of amaranth extract.**

Etapa	P (mg)	AI (mU mL ⁻¹)	AIE (mU mg ⁻¹)	GP (veces)
Extracto crudo	62.12 ± 16.45	1.177 ± 0.067	0.297 ± 0.072 c	1.00
Tratamiento calórico	48.06 ± 15.89	0.821 ± 0.149	0.247 ± 0.091 c	0.83
Permeado de 10 kDa	31.01 ± 0.49	1.297 ± 0.107	0.409 ± 0.030 b	1.38
F ₃₀₋₆₀ (NH ₄) ₂ SO ₄	16.50 ± 2.50	0.862 ± 0.087	0.767 ± 0.119 a	2.58

$\bar{X} \pm \sigma$ ($n=3$).

P: cantidad de proteína; AI: actividad inhibidora de papaína; AIE: actividad inhibidora específica de papaína; GP: grado de purificación. ♦ P: protein quantity; AI: papain inhibitory activity; AIE: papain specific inhibitory activity; GP: purification degree.

Medias con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$). ♦ Means with different letter are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$).

Durante este proceso de purificación hubo una pérdida global de 73% de proteínas.

En los extractos crudos obtenidos desde semillas de frijol, el tratamiento con calor permitió desnaturar proteínas en los extractos y aumentar el grado de pureza (Cuadro 3). La etapa de purificación parcial más eficiente para el extracto de frijol fue la ultrafiltración con membrana de 10 kDa, en cuyo permeado se alcanzó el mayor grado de pureza. El 47% de la cantidad total de proteínas disminuyó luego de estas dos etapas de procesamiento. El extracto semipurificado de frijol perdió por completo la AI durante la precipitación diferenciada con sulfato de amonio, por desnaturalización de las proteínas de interés, lo que determinó la exclusión de esta etapa del sistema de purificación parcial.

determined the exclusion of this stage from the partial purification system.

Although both papain inhibitors are protein-based in nature, the method of separation and purification depends on the presence of other proteins in the starting plant material. Therefore, it is important to establish efficient protocols for the purification of the IPs of interest.

Selective purification of semi-purified extracts

In the chromatogram corresponding to the selective purification of amaranth extract (Figure 1), two maxima (A and B) are observed, with protein concentration values of 0.106 and 0.031 mg mL⁻¹, respectively, which showed inhibition against papain.

Cuadro 3. Rendimientos en la purificación parcial del extracto de frijol.**Table 3. Performances in the partial purification of bean extract.**

Etapa	P (mg)	AI (mU mL ⁻¹)	AIE (mU mg ⁻¹)	GP (veces)
Extracto crudo	113.10 ± 22.05	1.556 ± 0.542	0.259 ± 0.115 b	1.00
Tratamiento calórico	97.36 ± 29.39	1.987 ± 0.398	0.357 ± 0.039 c	1.38
Permeado 10 kDa	59.84 ± 6.49	1.415 ± 0.063	0.388 ± 0.027 c	1.50
F ₃₀₋₆₀ (NH ₄) ₂ SO ₄	22.22 ± 9.68	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000 a	0.00

$\bar{X} \pm \sigma$ ($n=3$).

P: cantidad de proteína; AI: actividad inhibidora de papaína; AIE: actividad inhibidora específica de papaína; GP: grado de purificación. ♦ P: protein quantity; AI: papain inhibitory activity; AIE: papain specific inhibitory activity; GP: purification degree.

Medias con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$). ♦ Means with different letter are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$).

Aunque ambos inhibidores de papaína son de naturaleza proteínica, el método de separación y purificación depende de la presencia de otras proteínas en el material vegetal de partida. Por lo tanto, es importante establecer protocolos eficientes para la purificación de los IPs de interés.

Purificación selectiva de los extractos semipurificados

En el cromatograma correspondiente a la purificación selectiva del extracto de amaranto (Figura 1) se observan dos máximos (A y B), con valores de concentración de proteína de 0.106 y 0.031 mg mL⁻¹, respectivamente, que mostraron inhibición frente a papaína.

Las fracciones más activas (18 a la 22) presentaron AI de 2.80 mU mL⁻¹. La fracción con mayor actividad inhibidora específica (AIE) fue la 22 (1 398.06 mU mg⁻¹). En el lote de fracciones recolectadas de la 11 a la 16 (pico A) se obtuvo una [P] de 0.13 mg mL⁻¹, con una AI de 2.796 mU mL⁻¹ y un valor de AIE de 21.509 mU mg⁻¹ (Figura 1).

Este resultado indica que el grado de purificación por cromatografía de afinidad ascendió a 72.42 veces. El lote del pico B (fracciones de la 18 a la 22) tuvo una [P] de 0.053 mg mL⁻¹, con una inhibición de papaína de 2.165 mU mL⁻¹. Así, el lote B mostró la mayor inhibición sobre esta enzima con un grado de purificación de 137.54 veces.

El cromatograma para el extracto de frijol (Figura 2) reveló la presencia de tres máximos (C, D y E), que mostraron inhibición de papaína. En el lote del máximo de absorbancia C se recolectaron las fracciones de la 10 a la 13; en el lote del máximo D las fracciones de la 14 a la 17 y en el lote E las fracciones de la 18 a la 23.

La concentración máxima de proteínas en el primer pico fue 0.156 mg mL⁻¹; en el segundo 0.106 mg mL⁻¹ y en el tercero 0.137 mg mL⁻¹. El lote E mostró la mayor actividad inhibidora de papaína; los valores de [P], AI y AIE fueron 0.091 mg mL⁻¹, 1.864 mU mL⁻¹ y 20.484 mU mg⁻¹, respectivamente. Con la purificación selectiva se obtuvo un grado de purificación de 79.10 veces en el lote E.

Análisis de las fracciones purificadas por SDS-PAGE

El análisis electroforético (SDS-PAGE) de los lotes B (amaranto) y E (frijol), que presentaron mayor

The most active fractions (18 to 22) presented AI of 2.80 mU mL⁻¹. The fraction with the highest specific inhibitory activity (AIE) was number 22 (1398.06 mU mg⁻¹). In the pool of fractions collected from 11 to 16 (peak A), a protein concentration [P] of 0.13 mg mL⁻¹ was obtained, with an AI of 2.796 mU mL⁻¹, and an IAE value of 21.509 mU mg⁻¹ (Figure 1).

This result indicates that the degree of purification by affinity chromatography ascended to 72.42 times. The pool of peak B (fractions 18 to 22) had a [P] of 0.053 mg mL⁻¹, with a papain inhibition of 2.165 mU mL⁻¹. Thus, pool B showed the highest inhibition on this enzyme with a degree of purification of 137.54 times.

The chromatogram for the bean extract (Figure 2) revealed the presence of three maxima (C, D and E), which showed inhibition of papain. In the pool C of maximum absorbance, fractions 10 to 13 were collected; in the pool D, fractions 14 to 17, and in the pool E, fractions 18 to 23.

The maximum concentration of protein in the first peak was 0.156 mg mL⁻¹; in the second 0.106 mg mL⁻¹, and 0.137 mg mL⁻¹ in the third. Pool E showed the highest papain inhibitory activity; the values of [P], AI and AIE were 0.091 mg mL⁻¹, 1.864 mU mL⁻¹ and 20.484 mU mg⁻¹, respectively. With the selective purification, a purification degree of 79.10 times was obtained in pool E.

Fraction analysis purified by SDS-PAGE

The electrophoretic analysis (SDS-PAGE) of pools B (amaranth) and E (bean), which showed greater inhibitory activity against papain, showed a band at 7.50 kDa for pool B, and a band at 8.20 kDa for pool E, which is shown in Figure 3.

The homogeneity of these results indicates the feasibility of the process to perform the purification of papain inhibitors, present in the amaranth and bean extracts. Similar to the result found for the inhibitor molar mass from *A. caudatus* seeds, the electrophoresis studies carried out by Valdés-Rodríguez *et al.* (1993) showed the presence of an inhibitor with activity on proteases with a molar mass of 7.40 kDa, in proteinic extracts obtained from *Amaranthus hypochondriacus* seeds, and purified by HPLC.

The molar mass of cystatin isolated from common bean seeds, in the study by Santino *et al.* (1998), was

actividad inhibidora frente a papaína, mostró para el lote B una banda a 7.50 kDa; y para el lote E una banda a 8.20 kDa, lo cual se observa en la Figura 3.

La homogeneidad de estos resultados indica la factibilidad que tiene el proceso aplicado para efectuar la purificación de los inhibidores de papaína presentes en los extractos de amaranto y frijol. Similar al resultado encontrado para la masa molar del inhibidor procedente de las semillas de *A. caudatus*, los estudios de electroforesis realizados por Valdés-Rodríguez *et al.* (1993) mostraron la presencia de un inhibidor con actividad sobre proteasas con una masa molar de 7.40 kDa, en extractos proteínicos obtenidos desde semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y purificados por HPLC.

Mientras que la masa molar de la cistatina aislada al inicio desde semillas de frijol común, en el estudio de Santino *et al.* (1998) fue 37 kDa, aproximado, pero después de nuevas fases de purificación ellos detectaron otra molécula activa con una masa molar inferior a 12 kDa, lo cual sugiere la probabilidad de que la primera molécula corresponda a un trímero activo. Así, el resultado actual, obtenido luego de la ultrafiltración en membrana de 10 kDa, correspondería a la masa molecular de un monómero activo.

Caracterización cinética de los inhibidores de papaína

El comportamiento de la actividad de la papaína en ausencia y presencia del lote B, proveniente del extracto purificado de amaranto, establece que la inhibición es competitiva. La velocidad máxima ($V_{\text{máx}}$) no tuvo variaciones significativas, mientras que la constante de Michaelis-Menten (K_m) aparente aumentó en presencia del lote inhibidor B, como lo muestra la gráfica de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk (Figura 4).

Entre la papaína y el inhibidor de amaranto se encontró una alta afinidad, con una constante de inhibición (K_i) de $0.872 \mu\text{M}$ (Cuadro 4).

Al analizar la gráfica de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para la inhibición de papaína en presencia del lote inhibidor E, proveniente del extracto purificado de frijol (Figura 5), se observa la presencia de una inhibición no competitiva.

En presencia del inhibidor de frijol, la $V_{\text{máx}}$ aparente disminuyó y el valor de la constante K_m se mantuvo constante (Cuadro 5). Este comportamiento

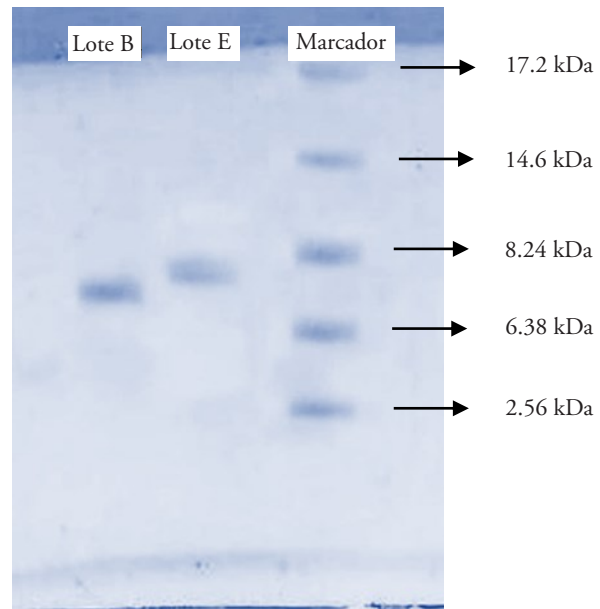


Figura 3. Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones inhibidoras. Lote B: amaranto; Lote E: frijol.

Figure 3. Analysis of the inhibitory fractions by SDS-PAGE. Pool B: amaranth; Pool E: bean.

approximately 37 kDa, but after further purification phases, they detected another active molecule with a molar mass of less than 12 kDa, which suggests the probability that the first molecule corresponds to an active trimer. Thus, the current result, obtained after ultrafiltration in 10 kDa membrane, would correspond to the molecular mass of an active monomer.

Kinetic characterization of papain inhibitors

The behavior of the papain activity in absence and presence of the pool B, coming from the purified extract of amaranth, establishes that the inhibition is competitive. The maximum speed (V_{max}) did not have significant variations, while the apparent Michaelis-Menten constant (K_m) increased in the presence of inhibitor pool B, as shown in the Lineweaver-Burk double reciprocal graph (Figure 4).

A high affinity was found between papain and amaranth inhibitor, with an inhibition constant (K_i) of $0.872 \mu\text{M}$ (Table 4).

When analyzing the Lineweaver-Burk double reciprocal graph for the inhibition of papain in the presence of inhibitor pool E, from the purified bean

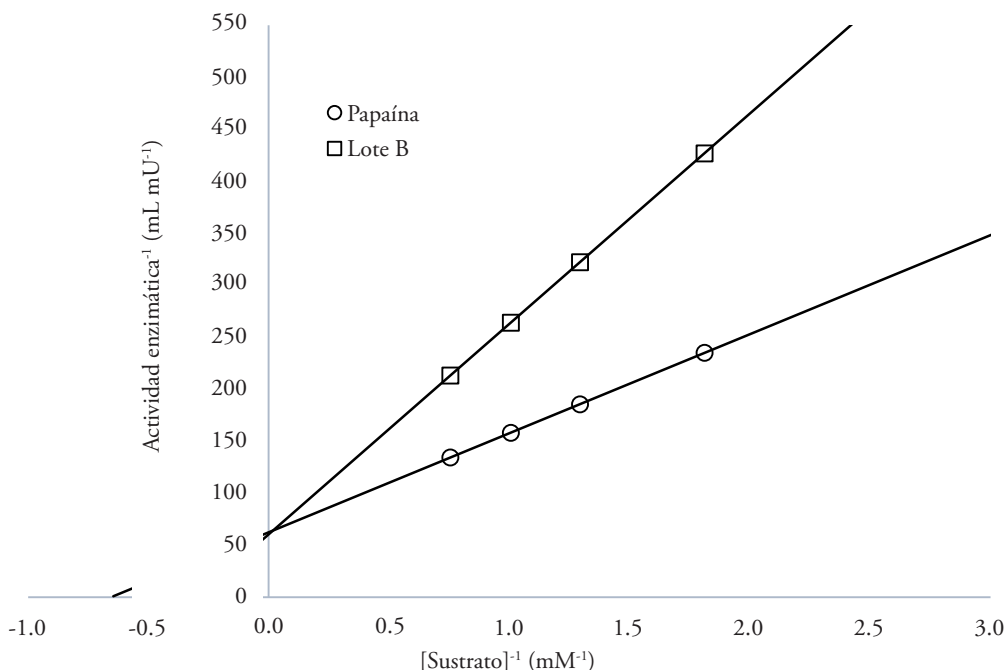


Figura 4. Gráfica de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para la actividad de papaína sin y con el lote inhibidor B de amaranto. Figure 4. Lineweaver-Burk double reciprocal graph for papain activity with and without the inhibitor pool B from amaranth.

revela la presencia de un inhibidor no competitivo. El valor de K_i para el inhibidor del extracto de frijol fue $0.058 \mu\text{M}$. Zhao *et al.* (1996) y Oukasha (2015) reportaron la presencia de inhibidores no competitivos de papaína en granos de soya ($K_i: 57 \times 10^{-3} \mu\text{M}$) y en cebada ($K_i: 1.95 \times 10^{-3} \mu\text{M}$); sin embargo, Barret (1987) menciona que las cistatinas que actúan sobre papaína presentan inhibiciones reversibles de tipo competitivo. Respecto a nuestro estudio se debe destacar que también se encontró inhibición reversible competitiva (amaranto) y no competitiva (frijol), y que el valor de la K_i encontrada en frijol coincide con la reportada para la soya.

CONCLUSIONES

La actividad inhibidora de la papaína en extractos proteicos de semillas de amaranto y frijol quedó demostrada. Los inhibidores se purificaron vía cromatografía de afinidad en una matriz de papaína-glioxil-sepharosa 6B-CL.

El extracto purificado de amaranto contiene un inhibidor competitivo que incrementa el valor de K_m aparente y mantiene el valor de $V_{m\acute{a}x}$; mientras que el de frijol, un inhibidor no competitivo, cuya

extract (Figure 5), the presence of a non-competitive inhibition is observed.

In the presence of the bean inhibitor, the apparent $V_{m\acute{a}x}$ decreased, and the value of the constant K_m remained constant (Table 5). This behavior reveals the presence of a non-competitive inhibitor. The K_i value for the bean extract inhibitor was $0.058 \mu\text{M}$. Zhao *et al.* (1996) and Oukasha (2015) reported the presence of non-competitive papain inhibitors in soybean ($K_i: 57 \times 10^{-3} \mu\text{M}$) and barley ($K_i: 1.95 \times 10^{-3} \mu\text{M}$). However, Barret (1987) indicates

Cuadro 4. Parámetros cinéticos de la inhibición de papaína por inhibidor de amaranto.

Table 4. Kinetic parameters of papain inhibition by amaranth inhibitor.

Papaína	$V_{m\acute{a}x}$ (U mL ⁻¹)	K_m (mM)
Sin inhibidor	$1.68 \times 10^{-2} \pm 0.01 \times 10^{-2}$ a	1.43 ± 0.11 a
Con el lote B	$1.70 \times 10^{-2} \pm 0.06 \times 10^{-2}$ a	3.36 ± 0.08 b

$\bar{X} \pm \sigma$ ($n=3$).

Medias con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes (T-student; $p \leq 0.05$). ♦ Means with different letter are statistically different (T-student; $p \leq 0.05$).

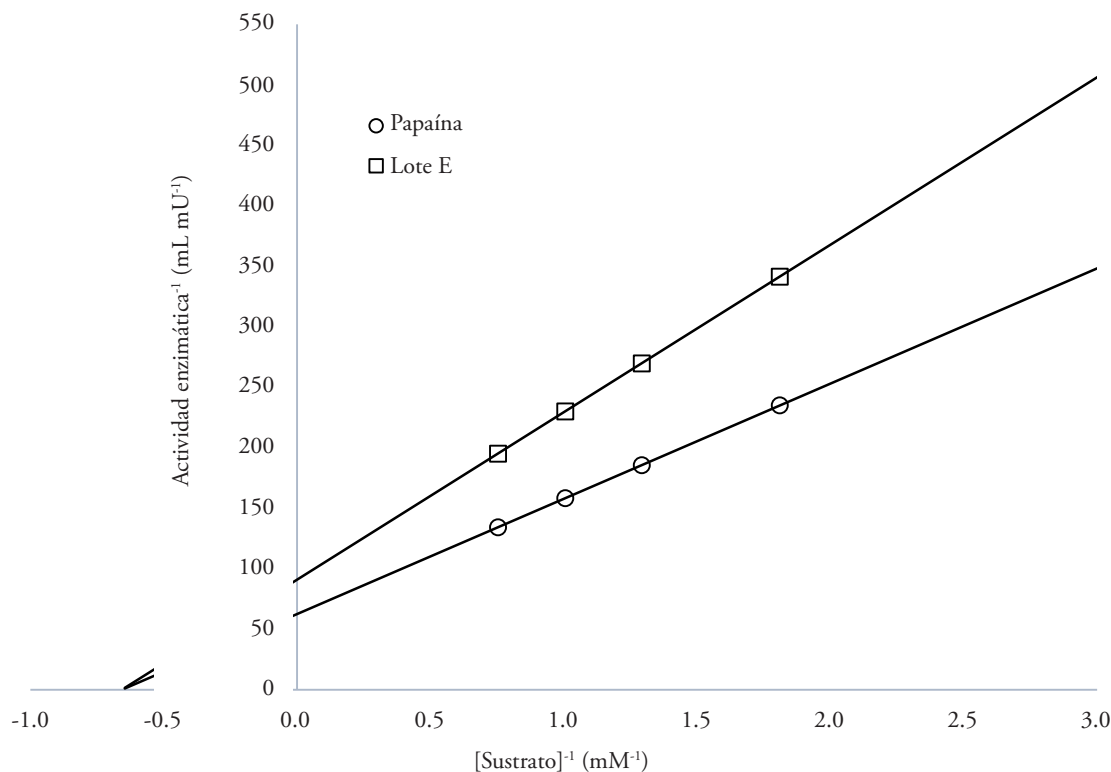


Figura 5. Gráfica de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk para la inhibición de papaína por inhibidor de frijol.
Figure 5. Lineweaver-Burk double reciprocal graph for papain activity with and without the inhibitor pool E from bean.

presencia no modifica el valor de la K_m , pero disminuye el valor de $V_{m\acute{a}x}$.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero proporcionado por la Escuela Politécnica Nacional (Quito) a través del proyecto de investigación semilla (código 15-15). Además, se extiende un agradecimiento al Ingeniero José Velásquez del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP estación Santa Catalina), por la donación de las semillas certificadas usadas en esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Barret, A. 1987. The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. *Trends Biochem. Sci.* 12: 193 - 196.
- Cruz, C. A., F. Massena, L. Migliolo, L. Macedo, N. Monteiro, A. Oliveira, F. Macedo, A. Uchoa, M. Grossi de Sá, I. Vasconcelos, A. Murad, O. Franco, and E. Santos. 2013. Bioinsecticidal activity of a novel Kunitz trypsin inhibitor from Catanduba (*Piptadenia moniliformis*) seeds. *Plant Physiol. Biochem.* 70: 61 - 68.

that cystatins acting on papain have reversible inhibitions of competitive type. Regarding our study, it should be highlighted that reversible competitive (amaranth) and non-competitive (bean) inhibition were also found, and that the K_i value, found in bean, matches the one reported for soybean.

Cuadro 5. Parámetros cinéticos de la inhibición de papaína por inhibidor de frijol.

Table 5. Kinetic parameters of papain inhibition by bean inhibitor.

Papaína	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mL ⁻¹)	K_m (mM)
Sin inhibidor	$1.68 \times 10^{-2} \pm 0.01 \times 10^{-2}$ a	1.43 ± 0.11 a
Con el lote E	$1.16 \times 10^{-2} \pm 0.08 \times 10^{-2}$ b	1.56 ± 0.08 a

$\bar{X} \pm \sigma$ ($n=3$).

Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (T-student; $p \leq 0.05$). ♦ Means with different letter are statistically different (T-student; $p \leq 0.05$)

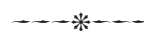
- Cutiño, B., D. Gil, C. Aragón, Y. Fernández, M. Hernández, E. Salas, M. Chávez, J. Guisán, J. Díaz, and A. Del Monte-Martínez. 2014. Computer-aided design of bromelain and papain covalent immobilization. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 16: 19 - 28.
- Chávez, M., J. Díaz, U. Pérez, y J. Delfín, 1990. *Temas de Enzimología*. Ed. ENPES. La Habana. 567 p.
- Delfín, J., Y. González, J. Díaz, and M. Chávez. 1994. Proteinase inhibitor from *Stichodactyla helianthus*: Purification, characterization and immobilization. *Arch. Medical Res.* 25: 199-204.
- Del Moral, S., L. P. Ramírez-Coutiño, y M. J. García-Gómez, 2015. Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. *Rev. Iberoam. Cienc. ISSN 2334-2501*. www.reibci.org.
- Earlanger, B., N. Kokowski, and W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95: 271 - 278.
- Eprintseva, A.T., D.N. Fedorina, A.V. Salnikova, and A.U. Igamberdiev. 2015. Expression and properties of the glyoxysomal and cytosolic forms of isocitrate lyase in *Amaranthus caudatus* L. *J. Plant Physiol.* 181: 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2015.02.014>
- Gruber, C. W., M. Cemazar, M. A. Anderson, and D. F. Craik. 2007. Insecticidal plant cyclotides and related cysteine knot toxins. *Toxicon* 49: 561 - 575.
- Guisán, J. 1988. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 10: 375 - 382.
- Haq, S. K., S. M. Atif, and R. H. Khan. 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Arch. Biochem. Biophys.* 431: 145 - 159.
- Hellinger, R., and C. W. Gruber. 2019. Peptide-based protease inhibitors from plants. *Drug Discovery Today* 24: 1877-1889. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.05.026>
- Hernández, M., P. Castillo, F. Muñoz, L. Quinchuela, P. Echeverría, G. Jácome, G. Covalada, S. Trejo, and F. Avilés. 2014. Isolation and purification of protease inhibitors from Latin-American plants. https://www.researchgate.net/profile/Martha_De_La_Caridad_Hernandez/publication/284158077_Aislamiento_y_purificacion_de_inhibidores_de_proteasas_a_partir_de_plantas_Latinoamericanas/links/564df99508ae4988a7a59df6.pdf?origin=publication_list (Consulta: diciembre 2017).
- Hines, M., C. Osuala, and S. Nielsen. 1992. Screening for cysteine proteinase inhibitor activity in legume seeds. *J. Sci. Food Agric.* 59: 555 - 557.
- Jamal, F., P. K. Pandey, D. Singh, and M. Y. Khan, 2013. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochem. Rev.* 12:1-34. DOI 10.1007/s11101-012-9231-y
- Kaur, A. M., and S. K. Sohal. 2016. Pea protease inhibitor inhibits protease activity and development of *Bactrocera cucurbitae*. *J. Asia-Pacific Entomol.* 19: 1183-1189. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2016.10.012>
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 - 685.

CONCLUSIONS

The papain inhibitory activity in protein extracts from amaranth and bean seeds was demonstrated. The inhibitors were purified via affinity chromatography in a papain-glyoxyl-sepharose 6B-CL matrix.

The purified amaranth extract contains a competitive inhibitor that increases the apparent Km value and maintains the Vmax value; while the bean extract, a non-competitive inhibitor, whose presence does not modify the Km value, decreases the Vmax value.

—End of the English version—



- Laskowski, M., M. Qasim, and S. Lu. 2003. Interaction of standard mechanism, canonical protein inhibitors with proteases. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 593 - 626.
- Lecaille, F., J. Kaleta, and D. Bromme. 2012. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: Their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem. Rev.* 102: 4459 - 4488.
- Lencastre, L.C., A. Faustino, A. Moreni, V. Santos-Ebinuma, P. Gava, and A. Pessoa. 2015. Stability, purification, and applications of Bromelain: A review. *Biotechnol. Prog.* Published on line in wileyonlinelibrary.com. DOI 10.1002/btpr.2190).
- Liang, G., G. Brookhart, G. Feng, G. Reeck, and K. Kramer. 1991. Inhibition of digestive proteinase of stored grain coleoptera by oryzacystatin, a cysteine proteinase inhibitor from rice 386 seed. *FEBS Letters* 278: 139 - 142.
- Molesini, B., D. Treggiari, A. Dalbeni, P. Minuz, and T. Pandolfini. 2017. Plant cysteine-knot peptides: pharmacological perspectives. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 83: 63 - 70.
- Nelson, D. L., and M. Cox. 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6th Ed. W. H. Freeman & Co., New York pp: 200 - 213.
- Oliveira, A.S., J. Xavier-Filho, and M. Sales. 2003. Cysteine proteinases and cystatins. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46: 91 - 104.
- Oliveira, A., L. Migliolo, R. Aquino, J. Ribeiro, L. Macedo, L., Andrade, M. Bemquerer, E. Santos, S. Kiyota, and M. De Sales. 2007. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its *in vitro* effects towards digestive enzymes from insect pests. *Plant Physiol. Biochem.* 45: 858 - 865.
- Oukasha Abd El-latif, A. 2015. Isolation and purification of a papain inhibitor from Egyptian genotypes of barley seeds and its *in vitro* and *in vivo* effects on the cowpea bruchid, *Callosobruchus maculatus* (F) *Pestic Biochem. Physiol.* 118: 26 - 32.

- Rosenberg, L., Y. Krieger, A. Bogdanov-Berezovski, E. Silberstein, Y. Shoham, and A. J. Singer. 2014. A novel rapid and selective enzymatic debridement agent for burn wound management: a multi-center RCT. *Burns* 40:466–474. DOI 10.1016/j.burns.2013.08.013.
- Samiksha, D. Singh, A. K. Kesavan, and S. K. Sohal. 2019. Purification of a trypsin inhibitor from *Psoralea corylifolia* seeds and its influence on developmental physiology of *Bactrocera cucurbitae*. *Int. J. Biol. Macromol.* 139: 1141-1150. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.063>
- Santino, A., A. Gallo, A. Leone, P. Poltronieri, and G. Zacheo. 1998. Purification and characterisation of a novel papain inhibitor from common vean (*Phaseolus vulgaris*) seed. *Physiol. Plant.* 104: 293 - 298.
- Schagger, H., and G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368 - 379.
- Siklos, M., M. BenAissa, and G. Thatcher. 2015. Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systemic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 5: 506 – 519.
- Silva, M., M. Brandao, J. Perdigão, R. Oliveira, M. Feliciano, and L. Da Silva. 2015. Partial purification of trypsin/papain inhibitors from *Hymenaea courbaril* L. seeds and antibacterial effect of protein fractions. *Hoehnea* 43: 11 - 18.
- Szewinska, J., J. Siminska, and W. Bielawski. 2016. The roles of cysteine proteases and phytocystatins in development and germination of cereal seeds. *J. Plant Physiol.* 207: 10 - 21.
- Valdés-Rodríguez, S., M. Segura-Nieto, A. Chagolla-Lopez, A. Vargas-Cortina, N. Martinez-Gallardo, and A. Blanco-Labra. 1993. Purification, characterization, and complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds. *Plant Physiol.* 103: 1407 - 1412.
- Wong, J., T. Ng, R. Cheung, X. Ye, H. Wang, S. Lam, P. Lin, Y. Chan, E. Fang, P. Ngai, L. Xia, X. Ye, Y. Jiang, and F. Liu. 2010. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87: 1221 - 1235.
- Zhao, Y., M. Botella, L. Subramanian, X. Niu, S. Nielsen, R. Bressan and P. Hasegawa. 1996. Two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog. *Plant Physiol.* 452: 1299 – 1306.

REGENERACIÓN *in vitro* DE PLANTAS DE *Tillandsia viridiflora* (Beer) Baker POR ORGANOGÉNESIS DIRECTA

In vitro PLANT REGENERATION OF *Tillandsia viridiflora* (Beer) Baker BY DIRECT ORGANOGENESIS

Jonathan Márquez-Martínez¹, María Cristina Guadalupe López-Peralta^{1*}, Eleodoro Hernández-Meneses², Nicacio Cruz-Huerta³

³Genética. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (cristy@colpos.mx). ²Ingeniería en Agronomía, TecNM - Campus Región Sierra, Carretera Teapa-Tacotalpa Km 4.5, Francisco Javier Mina, Teapa, Tabasco. 86801.

RESUMEN

Tillandsia viridiflora (Beer) Baker es una bromelia epífita endémica de México y la destrucción de su hábitat y comercio ilegal han propiciado su inserción como especie amenazada en la NOM-059-SEMARNAT-2010. Para su aprovechamiento comercial como planta ornamental se requiere un sistema de propagación masiva. Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* son una opción para producir gran cantidad de plantas. Los objetivos de este estudio fueron determinar las condiciones óptimas para regenerar plantas *in vitro* por organogénesis directa y aclimatarlas. La organogénesis se evaluó en medio Murashige-Skoog (MS) con 6-bencilaminopurina (BAP, 0.0 y 8.8 μM) y ácido naftalenacético (ANA, 0.0 y 2.1 μM) a partir de plántulas *in vitro* germinadas en medio MS con 50% de la concentración de sales. Grupos de brotes se colocaron en medio MS con ácido giberélico (AG_3 , 0 y 5.77 μM) para promover el alargamiento. El enraizamiento de brotes se evaluó en medio MS con 50% de la concentración de sales adicionado con ANA (0.00 y 2.15 μM) y ácido indol-3-butírico (AIB) (0.00 y 2.15 μM). En la aclimatación se evaluaron dos alturas de planta y dos tipos de sustrato: turba+perlita (1:1) y corteza de pino (*Pinus*). El estudio se estableció en un diseño completamente al azar y los datos obtenidos se analizaron con ANDEVA; para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey. La germinación fue 82% a las cinco semanas. En la organogénesis se indujeron 10.4 brotes por explante con 6.65 μM de BAP y 0.5 μM de ANA y en la multiplicación se obtuvieron 13 brotes con 4.4 μM de BAP y 0.5 μM de ANA, ambos casos en 12 semanas. El alargamiento mayor (1.5 cm) de los brotes se indujo con 5.7 μM de ácido giberélico. El mayor número de raíces (2.4 raíces por planta) se indujo con 1.0 μM de

ABSTRACT

Tillandsia viridiflora (Beer) Baker is an epiphytic bromeliad endemic to Mexico, and the destruction of its habitat and illegal trade have led to its inclusion in the list of endangered species in NOM-059-SEMARNAT-2010. For its commercial use as an ornamental plant, a massive propagation system is required. *In vitro* plant tissue culture techniques are an option for producing large numbers of plants. The objectives of this study were to determine the optimal conditions to regenerate plants *in vitro* by direct organogenesis and acclimatize them. Organogenesis was evaluated in Murashige-Skoog (MS) medium with 6-benzylaminopurine (BAP, 0.0 and 8.8 μM) and naphthaleneacetic acid (NAA, 0.0 and 2.1 μM) from *in vitro* seedlings germinated in MS medium with 50% of the salt concentration. Shoot groups were placed in MS medium with gibberellic acid (GA_3 , 0 and 5.77 μM) to promote elongation. Shoot rooting was evaluated in MS medium with 50% of the salt concentration added with NAA (0.00 and 2.15 μM) and indole-3-butyric acid (IBA) (0.00 and 2.15 μM). During acclimatization, we evaluated two plant heights and two types of substrates: peat + perlite (1:1) and pine bark (*Pinus*). We established a completely randomized design and the data obtained were analyzed with ANOVA; the Tukey test was used for the comparison of means. Germination was 82% in five weeks. In the organogenesis, 10.4 shoots were induced per explant with 6.65 μM of BAP and 0.5 μM of NAA, and the multiplication resulted in 13 shoots with 4.4 μM of BAP and 0.5 μM of NAA, both cases in 12 weeks. The largest elongation (1.5 cm) of the shoots occurred by adding 5.7 μM of gibberellic acid; and the highest number of roots (2.4 roots per plant) resulted from adding 1.0 μM NAA. In acclimatization, survival was 100% with 4.5 and 6.5 cm plants planted in peat+perlite and pine bark.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: junio, 2019. Aprobado: noviembre, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 763-777. 2020.

ANA. En la aclimatación la supervivencia fue 100% con plantas de 4.5 y 6.5 cm plantadas en turba+perlita y corteza de pino.

Palabras clave: epífitas, conservación de especies vulnerables, bromelia endémica, micropropagación, *Tillandsia viridiflora*, morfogénesis.

INTRODUCCIÓN

La diversidad florística de México incluye especies de valores estéticos que requieren estudios para su conservación y aprovechamiento, y dentro de ellas destacan las bromeliáceas. La belleza de las bromelias se reconoce en el mundo y existen especies que se usan como plantas de ornato. El manejo agronómico de estas plantas solo se conoce parcialmente y esto limita la producción comercial de plantas que satisfaga la demanda creciente. La extracción de ejemplares de su ambiente natural y el comercio ilegal aumentan de modo considerable (Vázquez *et al.*, 2014). Las bromelias comercializadas en mercados locales de México se extraen de los bosques para usarlas como fibras, alimento, follaje, medicina y decoración. Además, la destrucción de su hábitat natural las ha convertido en plantas amenazadas y en peligro de extinción (Méndez *et al.*, 2011).

En el mundo existen aproximadamente 60 géneros de bromelias que incluyen 3170 especies (Sheu *et al.*, 2017). El género *Tillandsia* L. es el más grande de la familia bromeliaceae, agrupa 21.2% del total de especies donde 94.6% son epífitas (Zotz, 2013). En México se ubican 422 especies de las cuales 230 (54.5%) son endémicas (Espejo-Serna y López-Ferrari, 2018). Las especies de *Tillandsia* se pueden usar como fibras, forrajes, combustible, medicinas y plantas ornamentales (Méndez *et al.*, 2011). La NOM-059-SEMARNAT-2010 incluye 21 especies de bromelias como amenazadas o protegidas o ambas de las cuales 81% son del género *Tillandsia*. Sin embargo, la mayoría de las especies requiere de protección especial porque necesitan hábitats específicos para sobrevivir (SEMARNAT, 2010).

Tillandsia viridiflora (Beer) Baker es una bromelia nativa de México, la cual habita en bosques de pino-encino, bosques de encino, bosques tropicales subcaducifolios y bosques mesófilos de montaña; se encuentra en altitudes de 1000 a 1800 m y su periodo de floración es de julio a diciembre. *T. viridiflora* es una especie rara y muy escasa reportada para los estados

Key words: epiphytes, conservation of vulnerable species, endemic bromeliad, micropropagation, *Tillandsia viridiflora*, morphogenesis.

INTRODUCTION

The floristic diversity of Mexico includes species of aesthetic value that require studies for their conservation and use, and bromeliads stand out among them. The beauty of bromeliads is recognized worldwide, and there are species that are used as ornamental plants. The agronomic management of these plants is only partially known, limiting then the commercial production of plants to meet an increasing demand. The extraction of specimens from their natural environment and illegal trade are on the rise (Vázquez *et al.*, 2014). Bromeliads which are sold in local markets in Mexico are extracted from the forests for use as fibers, food, foliage, medicine and decoration. Furthermore, the destruction of their natural habitat has turned them into threatened and endangered plants (Méndez *et al.*, 2011).

There are in the world approximately 60 genera of bromeliads that include 3170 species (Sheu *et al.*, 2017). The *Tillandsia* L. genus is the largest of the bromeliaceae family, with 21.2%, of which 94.6% are epiphytes (Zotz, 2013). In Mexico, there are 422 species of which 230 (54.5%) are endemic (Espejo-Serna and López-Ferrari, 2018). *Tillandsia* species can be used as fibers, fodder, fuel, medicine, and ornamental plants (Méndez *et al.*, 2011). The Mexican regulation code NOM-059-SEMARNAT-2010 includes 21 species of bromeliads as threatened or protected or both, 81% of them are in the *Tillandsia* genus. However, most species require special protection because they need specific habitats to survive (SEMARNAT, 2010).

Tillandsia viridiflora (Beer) Baker is a bromeliad native to Mexico that grows in pine-oak forests, oak forests, tropical subdeciduous forests and mountain mesophilic forests. It is found at altitudes of 1000 to 1800 m and its blooming period is from July to December. *T. viridiflora* is a rare and very scarce species found in the states of Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Querétaro and Veracruz (Espejo-Serna and López-Ferrari, 2018). The marketing of this bromeliad is illegal, as is the case of most bromeliad species in Mexico. There are no domestication

de Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Querétaro y Veracruz (Espejo-Serna y López-Ferrari, 2018). El comercio de esta bromelia es ilegal, al igual que en la mayoría de especies de bromeliáceas de México. Para esta especie silvestre no existen estudios de domesticación ni de cultivo. Los ejemplares comercializados como ornamentales son plantas silvestres que extraen de los bosques. Esta forma ilegal de aprovechamiento reduce las poblaciones naturales de forma irreversible.

En la actualidad no hay estudios sobre la propagación convencional o *in vitro* de *T. viridiflora*. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* ofrece una alternativa de propagación masiva. Estas técnicas, junto con nuevos desarrollos biotecnológicos, han contribuido a la propagación rápida y al rescate, conservación y aprovechamiento de especies vegetales vulnerables o en peligro de extinción. Las técnicas *in vitro* permiten la regeneración de plantas a partir de explantes, incluidas las semillas. (Anis and Ahmad, 2016).

La conservación y el aprovechamiento comercial requieren de técnicas de propagación que contrarresten el saqueo de ejemplares de su ambiente natural (Lavor *et al.*, 2014). El objetivo de esta investigación fue determinar las condiciones óptimas para regenerar plantas de *T. viridiflora* por organogénesis directa a partir de plántulas germinadas *in vitro* y aclimatarlas a condiciones de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fuente de semillas y desinfección

Las semillas sanas y de tamaño uniforme se recolectaron de cápsulas de plantas adultas procedentes de poblaciones silvestres, y se lavaron con agua y jabón comercial (Roma®) en agitación continua por 5 min seguidos de enjuagues con agua del grifo hasta eliminar el jabón. La desinfección superficial se basó en el procedimiento reportado para *Vriesea heliconioides* por Hernández-Meneses *et al.* (2018).

Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo utilizado en la germinación y en las etapas de la organogénesis fue el MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con sacarosa (30 g L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹), ácido nicotínico (0.5 mg L⁻¹), HCl-piridoxina (0.5 mg L⁻¹), HCl-tiamina (0.1 mg L⁻¹), glicina (2.0 mg L⁻¹) y solidificado con agar-agar (MP Biomedicals, LLC®, 7.5 g L⁻¹). El pH se ajustó a 5.7

or cultivation studies on this wild species. The specimens marketed as ornamentals are wild plants that are extracted from the forests. This illegal form of exploitation reduces natural populations irreversibly.

There are currently no studies on the conventional or *in vitro* propagation of *T. viridiflora*. *In vitro* plant tissue culture offers an alternative for mass propagation. These techniques, along with new biotechnological developments, have contributed to the rapid spread and rescue, conservation and use of vulnerable or endangered plant species. *In vitro* techniques allow the regeneration of plants from explants, including seeds (Anis and Ahmad, 2016).

Conservation and commercial use require propagation techniques that counteract the looting of specimens from their natural environment (Lavor *et al.*, 2014). The objective of this research was to determine the optimal conditions to regenerate *T. viridiflora* plants by direct organogenesis from *in vitro* germinated seedlings and acclimatize them to greenhouse conditions.

MATERIALS AND METHODS

Seed source and disinfection

Healthy seeds of uniform size were collected from capsules of adult plants from wild populations; we washed them with tap water and commercial soap (Roma®) in continuous agitation for 5 min, then we rinsed them with tap water to remove the soap. Surface disinfection was based on the procedure reported for *Vriesea heliconioides* by Hernández-Meneses *et al.* (2018).

Culture medium and incubation conditions

The culture medium used in germination and in the stages of organogenesis was MS (Murashige and Skoog, 1962), added with sucrose (30 g L⁻¹), myo-inositol (100 mg L⁻¹), nicotinic acid (0.5 mg L⁻¹), HCl-pyridoxine (0.5 mg L⁻¹), HCl-thiamine (0.1 mg L⁻¹), and glycine (2.0 mg L⁻¹) and solidified with agar-agar (MP Biomedicals, LLC®, 7.5 g L⁻¹). The pH was adjusted to 5.7 with NaOH or HCl 1N on a potentiometer (Thermo Scientific® Model Orion 3 Star) before adding the agar. We sterilized by using a vertical autoclave (AESA® 300) at 121 °C and 1.5 kg cm⁻² of pressure for 20 min. The cultures were incubated at 26±2 °C under photoperiod conditions of 16/8 h light/dark and light intensity of 45 µmol ms⁻¹ of cold white LED light.

con NaOH o HCl 1N en un potenciómetro (Thermo Scientific® Modelo Orion 3 Star) antes de agregar el agar. La esterilización se hizo en autoclave vertical (AESA® 300) a 121 °C y 1.5 kg cm⁻² de presión durante 20 min. Los cultivos se incubaron a 26±2 °C en condiciones de fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad e intensidad luminosa de 45 μmol m⁻² s⁻¹ de luz blanca fría LED.

Establecimiento *in vitro*

Semillas de ocho meses de edad se sembraron en medio MS con 50% de la concentración de sales para inducir la germinación *in vitro*; se usaron frascos de vidrio de 45 mL de capacidad con 15 mL de medio. Durante las primeras cuatro semanas, cada tercer día, se cuantificó la germinación (%) así como el inicio y término de la misma (número de días), la aparición de la primera hoja (días) y la aparición del sistema radicular (días). El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental fueron 10 semillas sembradas en cada frasco de cultivo.

Regeneración de plantas por organogénesis directa

Inducción de brotes

Plántulas germinadas *in vitro* de 25 semanas de edad y de 2 cm de altura se usaron como explantes, se establecieron en medio MS con BAP (0.00, 2.21, 3.32, 4.43, 5.54, 6.65 y 8.87 μM) combinadas con ANA (0.0 y 0.5 μM), y se usaron frascos de vidrio de 45 mL de capacidad con 15 mL de medio. Para evaluar las respuestas morfogénicas producidas por el BAP y ANA, en función del tiempo de exposición, se hicieron tres subcultivos a medio MS sin reguladores de crecimiento.

Cinco frascos con tres plántulas cada uno se transfirieron de los tratamientos de inducción a medio MS sin reguladores de crecimiento a las cuatro semanas, otro grupo de cinco frascos a las ocho semanas y un tercer grupo de cinco a las 12 semanas. Cada dos semanas, durante 12 semanas, se contabilizó la brotación (B, %; calculada por el número de explantes que formaron brotes) y el número de brotes por explante (BE). El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con 15 repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue un frasco de cultivo con tres plántulas.

Multiplicación de brotes

Brotes de 1.2 cm de longitud se cultivaron en medio MS con BAP (0.00, 2.21, 3.32, 4.43, 5.54 y 6.65 μM) combinados con ANA (0.0 y 0.5 μM); se usaron frascos de vidrio de 45 mL de capacidad con 15 mL de medio. Las respuestas morfogénicas

In vitro establishment

We sowed eight-month-old seeds in MS medium with 50% of the salt concentration to induce *in vitro* germination; and used 45 mL glass flasks with 15 mL medium. During the first four weeks, every third day, we quantified germination (%), as well as its beginning and end (number of days); we recorded the appearance of the first leaf (days) and the root system (days). The experiment was established in a completely randomized design with 10 replicates per treatment, where the experimental unit comprised 10 seeds sown in each culture flask.

Plant regeneration by direct organogenesis

Shoot induction

In vitro germinated seedlings, 25 weeks old and 2 cm high were used as explants, and we established them in MS medium with BAP (0.00, 2.21, 3.32, 4.43, 5.54, 6.65 and 8.87 μM) combined with NAA (0.0 and 0.5 μM), using 45 mL glass flasks with 15 mL medium. To evaluate the morphogenic responses produced by BAP and NAA in terms of the exposure time, we prepared three subcultures in MS medium without growth regulators.

Five flasks with three seedlings each from the induction treatments were transferred to MS medium without plant growth regulators at four weeks, another group of five flasks at eight weeks and a third group of five at 12 weeks. Every two weeks, for 12 weeks, we calculated the shooting (B, %; calculated by the number of explants that formed shoots) and the number of shoots per explant (BE). We set the experiment using a completely randomized design with 15 replicates per treatment; the experimental unit was a culture flask with three seedlings.

Shoot multiplication

Shoots 1.2 cm in length were grown in MS medium with BAP (0.00, 2.21, 3.32, 4.43, 5.54 and 6.65 μM) combined with NAA (0.0 and 0.5 μM); 45 mL glass flasks with 15 mL medium were used. We evaluated the morphogenic responses promoted by BAP and NAA, in relation to the exposure time, at the end of two subcultures in MS medium without plant growth regulators. We transferred a group of five flasks with three shoots each from the multiplication treatments to medium without plant growth regulators at eight weeks, and another group of five at 12 weeks. The same variables of shoot induction were quantified. We established the experiment in a completely randomized design and 10 replicates per treatment; the experimental unit was a culture flask with three shoots.

promovidas por el BAP y ANA, en función del tiempo de exposición, se evaluaron al término de dos subcultivos a medio MS sin reguladores de crecimiento. Un grupo de cinco frascos con tres brotes cada uno se transfirió de los tratamientos de multiplicación a medio sin reguladores de crecimiento a las ocho semanas y otro grupo de cinco a las 12 semanas. Las mismas variables de la inducción de brotes se cuantificaron. El experimento se estableció en diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue un frasco de cultivo con tres brotes.

Alargamiento de brotes

Grupos de brotes de 4 mm de longitud promedio, procedentes de la etapa de multiplicación, se cultivaron en medio MS con ácido giberélico (AG_3 ; 0, 1.44, 2.88, 4.33, 5.77 μM) para promover el alargamiento, y se usaron frascos de vidrio de 90 mL de capacidad con 30 mL de medio. Un subcultivo a los mismos tratamientos de AG_3 se hizo a las tres semanas, y a las seis semanas se cuantificó la longitud de brotes (cm) y el número de brotes por explante. El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con 15 repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue un grupo de brotes establecido en cada frasco de cultivo.

Enraizamiento de plantas

Brotes de 1 cm de longitud se establecieron en medio MS con 50% de la concentración de sales adicionado con ANA (1.07, 2.15 μM), ácido indolbutírico (AIB; 1.07, 2.15 μM) y un tratamiento sin reguladores de crecimiento. Frascos de vidrio se usaron, de 90 mL de capacidad con 30 mL de medio. A las tres semanas se hizo un subcultivo a los mismos tratamientos y después de seis semanas se cuantificó el enraizamiento (%), calculado por el número de brotes que generaron raíces, el número de raíces por brote (RB) y la longitud de raíz (LR, cm). El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fueron dos brotes por frasco de cultivo.

Aclimatación de plantas

Plantas enraizadas *in vitro* de 4.5 y 6.5 cm de altura se plantaron en dos tipos de sustrato: turba+perlita (1:1) y corteza de pino, y se usaron vasos de poliestireno expandido de 118 mL de capacidad con un domo del mismo material. Los riegos se hicieron cada semana con 50% de la concentración de sales del medio MS. Después de 11 semanas se cuantificó la supervivencia (%), altura de planta (AP, cm), longitud de raíz (LR, cm) y número de

Shoot elongation

We cultivated groups of shoots with an average length of 4 mm, from the multiplication stage, in MS medium with gibberellic acid (GA_3 ; 0, 1.44, 2.88, 4.33, 5.77 μM) to promote elongation, and utilized 90 mL glass flasks of 30 mL medium. We did a subculture with the same GA_3 treatments three weeks later, and at six weeks we registered the shoot length (cm) and the number of shoots per explant. The experiment was established with a completely randomized design and 15 replicates per treatment; the experimental unit was a group of shoots established in each culture flask.

Plant rooting

Shoots of 1 cm in length were established in MS medium with 50% of the salt concentration added with NAA (1.07, 2.15 μM), indole butyric acid (IBA; 1.07, 2.15 μM) and a treatment without plant growth regulators. We used 90 mL glass flasks with 30 mL medium. After three weeks, we prepared a subculture with the same treatments and after six weeks we estimated rooting (%), calculated by the number of shoots that generated roots, the number of roots per shoot (RB) and the root length (LR, cm). The experiment was established in a completely randomized design with 10 replicates per treatment; the experimental unit consisted of two shoots per culture flask.

Plant acclimatization

In vitro rooted plants 4.5 and 6.5 cm in height were planted in two types of substrate: peat + perlite (1:1) and pine bark, and used 118 mL expanded polystyrene cups with a dome-lid of the same material. Watering was made every week with 50% of the salt concentration of the MS medium. After 11 weeks, we recorded the survival (%), plant height (AP, cm), root length (LR, cm) and number of leaves (NH). The experiment was established in a completely randomized design with 20 replicates per treatment; the experimental unit consisted of a plant in each glass.

Statistical analysis

The data obtained in each experiment underwent analysis of variance with the SAS statistical package (SAS Institute, 2003), and the Tukey test ($p \leq 0.05$) was used for the comparison of means. The percentage values were transformed with the square root of $Y + 0.5$.

hojas (NH). El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con 20 repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue una planta en cada vaso.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en cada experimento se sometieron a análisis de varianza con el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se usó para la comparación de medias. Los valores de porcentaje se transformaron con la raíz cuadrada de $Y + 0.5$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento y germinación *in vitro*

Después de 21 semanas del establecimiento *in vitro* no se observó contaminación; por lo tanto, el método de desinfección superficial de las semillas fue confiable. Los resultados coincidieron con los de *Tillandsia gardneri*, en la cual se obtuvo el 100% de semillas libres de contaminación al utilizar diferentes combinaciones de concentraciones de hipoclorito de sodio (10-50%) y tiempos de inmersión (5-15 min) (Pinto *et al.*, 2012).

La germinación *in vitro*, considerada como la emergencia de la radícula, se presentó entre los 15 y 35 d después de la siembra (Figura 1A). La emergencia de la primera hoja se observó a los 24 d y el sistema radical a los 71 d. En otras bromelias como *Aechmea blanchetiana* la germinación *in vitro* se presentó entre 5 y 10 d después de la siembra, para las semillas colocadas bajo luz, y hasta 15 d después las que estuvieron en oscuridad.

En *A. distichantha* la germinación inició a los 5 d después de la siembra y continuó hasta 40 d después para las semillas mantenidas bajo luz y oscuridad, respectivamente (Santa-Rosa *et al.*, 2013). Estas diferencias de germinación entre especies de bromelias se deben al grado de madurez de las semillas y las condiciones de luz (Silveira *et al.*, 2009). En nuestro estudio la germinación de *T. viridiflora* se obtuvo en condiciones de fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad.

La germinación de *T. viridiflora* fue 94%, un porcentaje similar a los consignados para otras especies de bromelias. En *Vriesea incurvata* la germinación *in vitro* fue 93.9% (Pulido-Rueda *et al.*, 2018) y en *Neoglaziovia variegata* la germinación fue de 80 a 100% (Silveira *et al.*, 2009). Las plántulas de *T. viridiflora*

RESULTS AND DISCUSSION

In vitro establishment and germination

After 21 weeks of *in vitro* establishment, we observed no contamination; therefore, the surface seed disinfection method was reliable. The results coincided with those of *Tillandsia gardneri*, in which 100% contamination-free seeds resulted by using different combinations of sodium hypochlorite concentrations (10-50%) and immersion times (5-15 min) (Pinto *et al.*, 2012).

In vitro germination, considered as the emergence of the radicle, occurred between 15 and 35 d after sowing (Figure 1A). The emergence of the first leaf occurred at 24 d and the root system at 71 d. In other bromeliads such as *Aechmea blanchetiana*, *in vitro* germination of the seeds placed under light occurred between 5 and 10 d after sowing, and up to 15 d later those that were in darkness.

A. distichantha began germination 5 d after sowing and continued up to 40 d later, seeds kept under light and darkness, respectively (Santa-Rosa *et al.*, 2013). These differences in germination between bromeliad species are due to the degree of maturity of the seeds and light conditions (Silveira *et al.*, 2009). In our study, the germination of *T. viridiflora* occurred under photoperiod conditions of 16/8 h light/dark.

The germination of *T. viridiflora* was 94%, a percentage similar to those recorded for other species of bromeliads. In *Vriesea incurvata* the *in vitro* germination was 93.9% (Pulido-Rueda *et al.*, 2018), and in *Neoglaziovia variegata* germination was 80 to 100% (Silveira *et al.*, 2009). *T. viridiflora* seedlings reached an average size of 16.8 mm with 2.1 roots after 21 weeks of *in vitro* establishment. This response demonstrated the slow growth of bromeliads and there are no reports on this in the literature; hence we evaluated it in the present study.

The capsules of *T. viridiflora* contained an average of 500 seeds, and the weight of 1000 seeds, without the feathery appendix, was 400 mg. In the genus *Tillandsia* the quantity of seeds per capsule is variable. In *T. stricta*, an average of 27 seeds per fruit were reported (Missagia and Alves, 2015), 115 in *T. achyrostachys*, 106 in *T. caput-medusae*, 92 in *T. circinnatioides*, 190 in *T. hubertiana*, and 99 in *T. schiedeana* (Flores-Palacios *et al.*, 2015). In *T. californii*

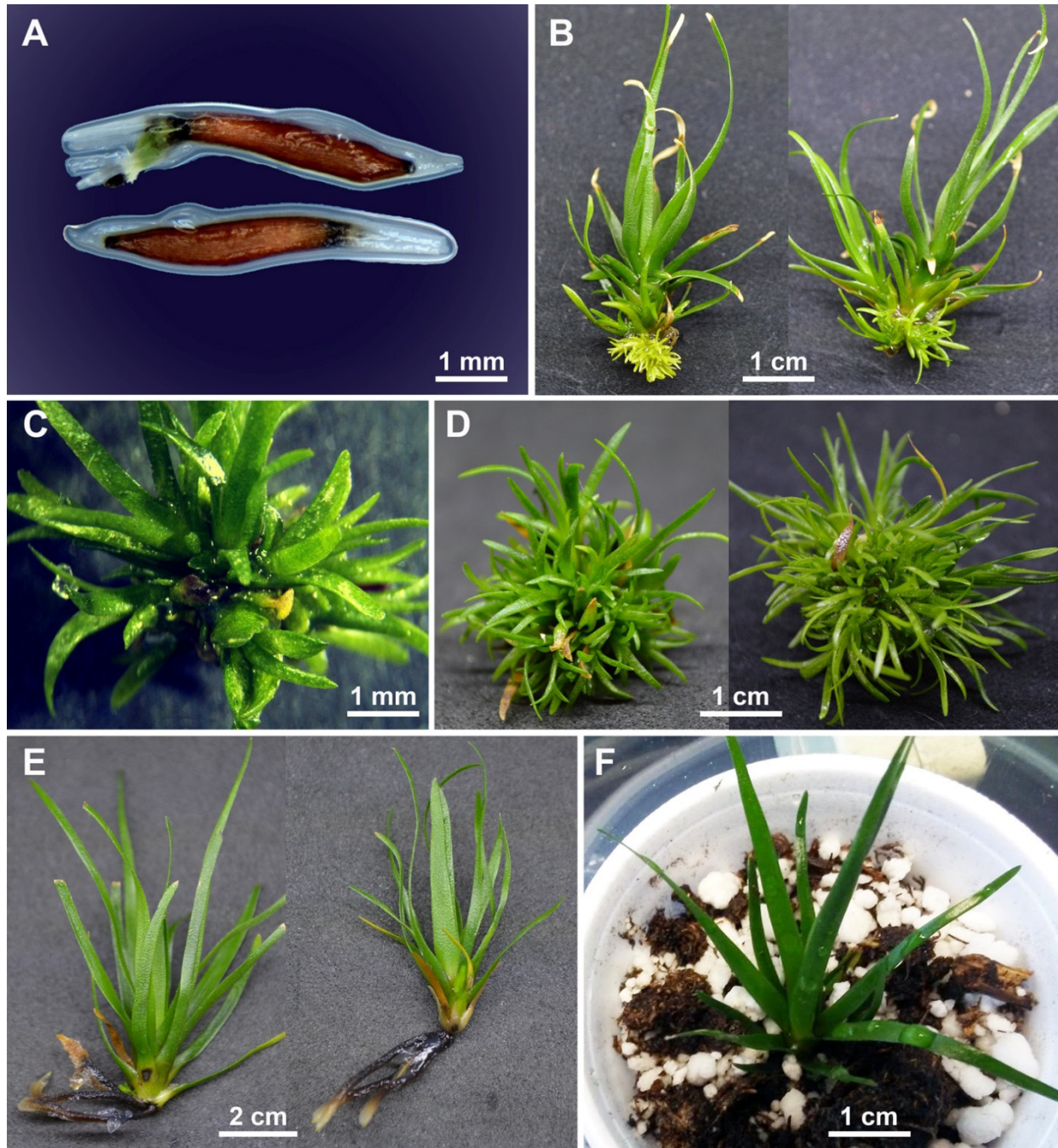


Figura 1. Regeneración *in vitro* de *Tillandsia viridiflora* por organogénesis directa. A) Germinación *in vitro* después de dos semanas de cultivo; B) Brotes inducidos con $6.65 \mu\text{M}$ de BAP y $0.5 \mu\text{M}$ de ANA a las 12 semanas; C) Multiplicación de brotes con $4.43 \mu\text{M}$ de BAP y $0.5 \mu\text{M}$ de ANA después de 12 semanas de cultivo; D) Alargamiento de brotes con $5.7 \mu\text{M}$ de AG_3 después de seis semanas de cultivo; E) Enraizamiento *in vitro* con $1.0 \mu\text{M}$ de ANA después de seis semanas de cultivo; F) Aclimatación de plantas después de 11 semanas.

Figure 1. *In vitro* regeneration of *Tillandsia viridiflora* by direct organogenesis. A) *In vitro* germination after two weeks of culture; B) Shoots induced with $6.65 \mu\text{M}$ of BAP and $0.5 \mu\text{M}$ of NAA at 12 weeks; C) Shoot multiplication with $4.43 \mu\text{M}$ of BAP and $0.5 \mu\text{M}$ of NAA after 12 weeks of culture; D) Shoot elongation with $5.7 \mu\text{M}$ GA_3 after six weeks of culture; E) *In vitro* rooting with $1.0 \mu\text{M}$ NAA after six weeks of culture; F) Plant acclimatization after 11 weeks.

alcanzaron un tamaño promedio de 16.8 mm con 2.1 raíces después de 21 semanas del establecimiento *in vitro*. Esta respuesta demostró el crecimiento lento de las bromelias y en la literatura no hay documentación al respecto, por ello se evaluó en el presente estudio.

Las cápsulas de *T. viridiflora* contenían en promedio 500 semillas y el peso de 1000 semillas, sin el apéndice plumoso, fue de 400 mg. En el género *Tillandsia* la cantidad de semillas por cápsula es variable. En *T. stricta* se registraron en promedio 27 semillas por fruto (Missagia y Alves, 2015), 115 en *T. achyrostachys*, 106 en *T. caput-medusae*, 92 en *T. circinnatioides*, 190 en *T. hubertiana* y 99 en *T. schiedeana* (Flores-Palacios *et al.*, 2015). En *T. califanii* Rauh se encontró la cantidad mayor con 2000 semillas por fruto (García-Suárez *et al.*, 2006).

Respecto al medio de cultivo usado para la germinación *in vitro*, Calderón-Arias *et al.* (2011) mencionaron que las semillas de bromelias son sensibles a niveles altos de sales en el medio de cultivo en la etapa inicial. Pulido-Rueda *et al.* (2018) indicaron que el 50% de la concentración de sales del medio MS es favorable para la germinación en *V. incurvata*. La germinación de semillas de bromelias en su ambiente natural es variable y las condiciones ambientales la afectan. Para *Tillandsia monadelphica*, *T. bulbosa*, *T. anceps*, *T. subulifera* y *T. fasciculata* los porcentajes pueden fluctuar entre 97 y 100% (Correa y Zotz, 2014).

Regeneración de plantas por organogénesis directa

Inducción de brotes

La brotación se presentó en todos los tratamientos, incluido el medio sin reguladores de crecimiento; y fue del 100% con las concentraciones de 2.21, 3.32 y 4.43 μM de BAP combinadas con 0.5 μM de ANA después de 12 semanas de cultivo. La cantidad mayor de brotes por explante (10.4) se obtuvo con 6.65 μM de BAP y 0.5 μM de ANA a las 12 semanas (Figura 1B). En contraste, el medio sin reguladores de crecimiento solo produjo 0.3 brotes por explante (Cuadro 1).

Los brotes se observaron desde la segunda semana de cultivo en los tratamientos con reguladores de crecimiento, se formaron en la base de la plántula, presentaron coloración verde claro y morfología

Rauh, the highest quantity was reported with 2000 seeds per fruit (García-Suárez *et al.*, 2006).

Regarding the culture medium used for *in vitro* germination, Calderón-Arias *et al.* (2011) mentioned that bromeliad seeds are sensitive to high levels of salts in the culture medium in the initial stage. Pulido-Rueda *et al.* (2018) indicated that 50% of the salt concentration of the MS medium is favorable for germination in *V. incurvata*. The germination of bromeliad seeds in their natural environment is variable and environmental conditions affect them. For *Tillandsia monadelphica*, *T. bulbosa*, *T. anceps*, *T. subulifera* and *T. fasciculata*, percentages can fluctuate between 97 and 100% (Correa and Zotz, 2014).

Plant regeneration by direct organogenesis

Shoot induction

Shooting occurred in all treatments, including the medium without plant growth regulators; and it was 100% with the concentrations of 2.21, 3.32 and 4.43 μM of BAP combined with 0.5 μM of NAA after 12 weeks of culture. The highest number of shoots per explant (10.4) was obtained with 6.65 μM of BAP and 0.5 μM of NAA at 12 weeks (Figure 1B). In contrast, the medium without plant growth regulators only produced 0.3 shoots per explant (Table 1).

Shoots emerged at the second week of cultivation in the treatments with plant growth regulators; they were formed at the base of the seedling, and showed light green coloration and uniform morphology. After 12 weeks, shoots did not exceed 1 or 2 mm in length; and we used a stereoscopic microscope for the count.

Studies on *in vitro* propagation of bromeliads are scarce, but the species (as a factor) influence the organ-generation response. In *T. fasciculata* var. *fasciculata*, 75% shooting was induced with 0.5 μM of BAP and 0.5 μM of NAA (Koh and Davies, 2001). On the other hand, in *Tillandsia gardneri*, the highest shooting (91.67%) and the highest number of shoots per explant (1.92) were induced with 8.87 BAP μM (Pinto *et al.*, 2013). In the case of *Vriesea heliconioides*, 6.8 shoots per explant emerged by adding 10 μM of BAP and 1 μM of NAA (Hernández-Meneses *et al.*, 2018). In *Orthophytum grossiorum*, 18.3% of the explants generated shoots with 10 BAP μM added to a stationary liquid medium (Manfio *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Respuestas organogénicas de *Tillandsia viridiflora* en la inducción de brotes a partir de plántulas *in vitro* con 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) a las cuatro, ocho y doce semanas de cultivo.

Table 1. Organ-generation responses of *Tillandsia viridiflora* in the induction of shoots from seedlings *in vitro* with 6-benzylaminopurine (BAP) and naphthaleneacetic acid (NAA) at four, eight and twelve weeks of culture.

BAP + ANA (μ M)	4 semanas		8 semanas		12 semanas	
	B (%)	BE (Núm.)	B (%)	BE (Núm.)	B (%)	BE (Núm.)
0 + 0	20.0 b	0.3 d	20.0 b	0.3 e	20.0 b	0.3 d
2.21 + 0.5	86.7 a	3.1 c	80.0 a	2.6 d	100.0 a	5.2 c
3.32 + 0.5	86.7 a	5.5 abc	73.3 a	3.6 cd	100.0 a	8.3 b
4.43 + 0.5	73.3 a	6.8 a	100.0 a	5.4 bc	100.0 a	9.0 ab
5.54 + 0.5	73.3 a	6.1 ab	100.0 a	5.6 b	86.7 a	9.0 ab
6.65 + 0.5	66.7 a	4.0 bc	86.7 a	9.7 a	93.3 a	10.4 a

Medias con diferente letra en una columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$). B=Brotación, BE=Brotes por explante. ♦ Means with different letters in a column are significantly different ($p \leq 0.05$). B=Shooting, BE=shoots per explant.

uniforme. Después de 12 semanas los brotes no superaron 1 o 2 mm de longitud; y el conteo se hizo con un microscopio estereoscópico.

Los estudios sobre propagación *in vitro* de bromelias son escasos, pero se ha demostrado que el factor especie influye en las respuestas organogénicas. En *T. fasciculata* var. *fasciculata* se indujo 75% de brotación con 0.5 μ M de BAP y 0.5 μ M de ANA (Koh y Davies, 2001). En cambio, en *Tillandsia gardneri* la brotación mayor (91.67%) y cantidad mayor de brotes por explante (1.92) se indujo con 8.87 μ M de BAP (Pinto *et al.*, 2013). En el caso de *Vriesea heliconioides* se obtuvieron 6.8 brotes por explante con 10 μ M de BAP y 1 μ M de ANA (Hernández-Meneses *et al.*, 2018). En *Orthophytum grossiorum* 18.3% de los explantes generó brotes con 10 μ M de BAP en medio líquido estacionario (Manfio *et al.*, 2010).

Multiplicación de brotes

La brotación fue 100% en las concentraciones de 4.4, 5.5 y 6.6 μ M de BAP combinadas con 0.5 μ M de ANA después de 12 semanas de cultivo. La cantidad mayor de brotes por explante (13.0) se obtuvo con 4.4 μ M de BAP y 0.5 μ M de ANA (Figura 1C). En contraste, el medio sin reguladores de crecimiento sólo produjo 0.4 brotes (Cuadro 2). El crecimiento fue similar a la fase de inducción y después de 12 semanas se observaron brotes de 1 o 2 mm de longitud.

Shoot multiplication

Shooting was 100% in concentrations of 4.4, 5.5 and 6.6 μ M BAP combined with 0.5 μ M NAA after 12 weeks of culture. The highest number of shoots per explant (13.0) occurred with 4.4 μ M of BAP and 0.5 μ M of NAA (Figure 1C). In contrast, the medium without plant growth regulators only produced 0.4 shoots (Table 2). Growth was similar to the induction phase and, after 12 weeks, shoots of 1 or 2 mm in length emerged.

In the micropropagation of some species of bromeliads, the induction phase is separated from the shoot multiplication phase (Guerra and Dal Vesco, 2010). However, these two stages are closely related. In *Nidularium procerum*, we obtained the best results for the multiplication of 14.9 shoots per explant with 4 μ M BAP; in contrast, for *N. innocentii* it was 2.8 shoots per explant with 8 μ M BAP (Da Silva *et al.*, 2012).

The results of *T. viridiflora* are similar to those documented in *Tillandsia gardneri*. The highest shooting percentage (91.6%) and the highest number of shoots per explant (1.9) were obtained with 8.87 μ M BAP (Pinto *et al.*, 2013). Other studies showed that the combination of BAP and NAA induces the *in vitro* morphogenesis of bromeliads. In *Aechmea blanchetiana*, 105.6 shoots were produced per explant and 223.8 in *Aechmea distichantha* with

Cuadro 2. Respuestas organogénicas de *Tillandsia viridiflora* en la multiplicación de brotes con 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) a las ocho y doce semanas de cultivo.

Table 2. Organ-generation response of *Tillandsia viridiflora* in shoot multiplication with 6-benzylaminopurine (BAP) and naphthaleneacetic acid (NAA) at 8- and 12 weeks of culture.

BAP + ANA (μM)	8 semanas		12 semanas	
	B (%)	BE (Núm.)	B (%)	BE (Núm.)
0 + 0	20.0 b	0.3 e	20.0 b	0.4 c
2.21 + 0.5	80.0 a	2.2 cd	93.3 a	6.3 b
3.32 + 0.5	93.3 a	8.7 a	86.6 a	12.8 a
4.43 + 0.5	73.3 a	4.5 b	100.0 a	13.0 a
5.54 + 0.5	86.6 a	3.4 bc	100.0 a	5.7 b
6.65 + 0.5	73.3 a	1.8 de	100.0 a	6.9 b

Medias con letra diferente por columna indican diferencia estadística ($p \leq 0.05$). B=Brotación; BE=Brotes por explante. ♦ Means with different letters per column indicate statistical difference ($p \leq 0.05$). B= Shooting, BE = Shoots per explant.

En la micropropagación de algunas especies de bromelias se separan la fase de inducción de la de multiplicación de brotes (Guerra y Dal Vesco, 2010). Sin embargo, estas dos etapas se relacionan de manera estrecha. En *Nidularium procerum* los resultados mejores para la multiplicación de 14.9 brotes por explante se obtuvieron con $4 \mu\text{M}$ de BAP; en cambio, para *N. innocentii* fue de 2.8 brotes por explante con $8 \mu\text{M}$ de BAP (Da Silva *et al.*, 2012).

Los resultados de *T. viridiflora* son similares con los documentados en *Tillandsia gardneri*. El porcentaje de brotación mayor (91.6%) y la cantidad mayor de brotes por explante (1.9) se obtuvieron con $8.87 \mu\text{M}$ de BAP (Pinto *et al.*, 2013). Otros estudios demostraron que la combinación de BAP y ANA inducen la morfogénesis *in vitro* de bromelias. En *Aechmea blanchetiana* se produjeron 105.6 brotes por explante y 223.8 en *Aechmea distichantha* con $2.2 \mu\text{M}$ de BAP y $0.5 \mu\text{M}$ de ANA (Santa-Rosa *et al.*, 2013). En *Vriesea cacuminis* se obtuvieron 9.3 brotes por explante con $15 \mu\text{M}$ de BAP y $4.5 \mu\text{M}$ de ANA (Resende *et al.*, 2014). En *Vriesea heliconioides* $10 \mu\text{M}$ de BAP y $1 \mu\text{M}$ de ANA favorecieron la multiplicación de 7.4 brotes por explante (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

La capacidad de regeneración *in vitro* aumenta con la adición de BAP porque el compuesto estimula la división celular. El potencial de regeneración es

$2.2 \mu\text{M}$ de BAP y $0.5 \mu\text{M}$ de NAA (Santa-Rosa *et al.*, 2013). In *Vriesea cacuminis*, 9.3 shoots grew per explant with $15 \mu\text{M}$ of BAP and $4.5 \mu\text{M}$ of NAA (Resende *et al.*, 2014). In *Vriesea heliconioides*, $10 \mu\text{M}$ of BAP and $1 \mu\text{M}$ of NAA favored the multiplication of 7.4 shoots per explant (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

In vitro regeneration capacity increases with the addition of BAP because the compound stimulates cell division. The regeneration potential is greater as more cells are produced in a tissue (Anis and Ahmad, 2016). The variable number of shoots found per different species of bromeliads shows the influence of genotype and plant growth regulators on morphogenesis. BAP is the most widely used plant growth regulator in the *in vitro* regeneration of bromeliads; however, the use of N6 (2-isopentenyl) adenine (2-iP), as documented by other studies, is the cause of the proliferation of callus-like nodules in *Vriesea reitzii* (Dal Vesco *et al.*, 2014). In the micropropagation of *Neoglaziovia variegata*, kinetin favored the best response (Silveira *et al.*, 2009).

Shoot elongation

The best response of shoot elongation (1.5 cm) resulted from $5.7 \mu\text{M}$ of GA_3 at eight weeks of culture (Figure 1D) (Table 3).

mayor conforme se producen más células en un tejido (Anis y Ahmad, 2016). La cantidad variable de brotes encontrada por especies diferentes de bromelias demuestra la influencia del genotipo y los reguladores de crecimiento en la morfogénesis. La BAP es el regulador más usado en la regeneración *in vitro* de bromelias; sin embargo, también se ha descrito que el uso de N6 (2-isopentenil) adenina (2-iP) causa la proliferación de nódulos semejantes a un callo en *Vriesea reitzii* (Dal Vesco *et al.*, 2014). En la micropropagación de *Neoglaziovia variegata*, la cinetina favoreció la respuesta mejor (Silveira *et al.*, 2009).

Alargamiento de brotes

La respuesta mejor de alargamiento de brotes (1.5 cm) se obtuvo con 5.7 μM de AG_3 a las ocho semanas de cultivo (Figura 1D) (Cuadro 3).

En otras bromelias se ha reportado el crecimiento lento en condiciones *in vitro*, al igual que lo observado en *Tillandsia viridiflora*. Los brotes pueden requerir de 3 a 7 meses para alcanzar 1 cm de altura; como se ha reportado en *Alcantarea imperialis* (Mollo *et al.*, 2011), *Acanthostachys strobilacea* (Carvalho *et al.*, 2014), *Vriesea reitzii* (Dal Vesco *et al.*, 2014) y *Vriesea heliconioides* (Hernández-Meneses *et al.*, 2018). El crecimiento de las bromelias es lento en su hábitat natural y requieren años para alcanzar el estado adulto (Vázquez *et al.*, 2014). El crecimiento lento (1-2 mm en tres meses) también se observó en nuestro estudio bajo condiciones *in vitro* y por eso resultó importante usar el ácido giberélico (AG_3) para promover el crecimiento de brotes y plantas. El número de brotes se contabilizó a partir de los grupos de brotes ya inducidos, y solo se midió el alargamiento de los mismos.

El AG_3 participa en el desarrollo vegetal y en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se usa para promover el alargamiento celular de tallos y hojas (Anis y Ahmad, 2016). En *Vriesea reitzii* el alargamiento de los brotes fue óptimo con 10 μM de AG_3 y 2 μM de ácido indolacético (AIA) (Dal Vesco *et al.*, 2014). En *Vriesea heliconioides* 1 μM de AG_3 fue óptimo para lograr el alargamiento de brotes con promedio de 7.6 cm (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

Enraizamiento de plantas

El porcentaje mayor de enraizamiento (95%) se obtuvo con 2.1 μM de AIB. El número mayor de

Cuadro 3. Alargamiento de brotes *in vitro* de *Tillandsia viridiflora* con ácido giberélico (AG_3) a las ocho semanas de cultivo.

Table 3. *In vitro* shoot elongation of *Tillandsia viridiflora* with gibberellic acid (GA_3) at eight weeks of culture.

AG_3 (μM)	Longitud del brote (cm)	Número de brotes (Núm.)
0	1.1 c	18.8 a
1.4	1.3 b	15.7 b
2.8	1.3 b	14.0 b
4.3	1.1 c	14.2 b
5.7	1.5 a	14.8 b

Medias con letra diferente por columna indican diferencia estadística ($p \leq 0.05$). ♦ Means with different letters per column indicate statistical difference ($p \leq 0.05$).

In other bromeliads, growth is slow under *in vitro* conditions, as seen in *Tillandsia viridiflora*. Shoots may require 3 to 7 months to reach 1 cm in height; as reported for *Alcantarea imperialis* (Mollo *et al.*, 2011), *Acanthostachys strobilacea* (Carvalho *et al.*, 2014), *Vriesea reitzii* (Dal Vesco *et al.*, 2014) and *Vriesea heliconioides* (Hernández-Meneses *et al.*, 2018). The growth of bromeliads is slow in their natural habitat and require years to reach adulthood (Vázquez *et al.*, 2014). We also observed slow growth (1-2 mm in three months) in our study under *in vitro* conditions, and therefore it was important to use gibberellic acid (GA_3) to promote shoot and plant growth. We counted the number of shoots from the groups of shoots already induced, and then only their elongation was measured.

The GA_3 participates in plant development, and is used *in vitro* plant tissue culture to promote cell elongation of stems and leaves (Anis and Ahmad, 2016). In *Vriesea reitzii*, shoot elongation was optimal with 10 μM of GA_3 and 2 μM of indoleacetic acid (IAA) (Dal Vesco *et al.*, 2014). In *Vriesea heliconioides*, 1 μM of GA_3 was optimal to achieve shoot elongation with an average of 7.6 cm (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

Plant rooting

The highest percentage of rooting (95%) was obtained with 2.1 μM IBA; and we induced the highest number of roots with 1.0 μM NAA with 2.4 roots per plant (Figure 1E), although the highest root

raíces se indujo con 1.0 μM de ANA con 2.4 raíces por planta (Figura 1E), aunque la longitud mayor de raíz (1.5 cm) se obtuvo con 1.0 y 2.1 μM de AIB (Cuadro 4). El enraizamiento se observó desde la segunda semana de cultivo en todos los tratamientos. Las raíces fueron de color blanco claro y después de la tercera semana se tornaron de color café oscuro. El enraizamiento *in vitro* se induce al reducir las concentraciones de citocininas del medio de cultivo y aumentar las de auxinas (Anis y Ahmad, 2016). El ANA y el AIB son auxinas usadas para inducir el enraizamiento de plantas *in vitro* (Uribe *et al.*, 2012). En bromelias se ha encontrado que ambas auxinas favorecen el enraizamiento de plantas, aunque también se ha usado el AIA como inductor de brotes.

En *Nidularium innocentii* el enraizamiento fue 70% en medio líquido con 5.4 μM de ANA (Da silva *et al.*, 2012). En *N. concentrica* el enraizamiento se obtuvo con 3 μM de ANA a los 30 d y con 2, 3 y 4 μM de ANA, y 1 μM de AIB a los 60 d (Rodrigues *et al.*, 2013). En *V. cacuminis* 1.5 y 4.5 μM de ANA indujeron 1.9 raíces por planta después de 90 d de cultivo (Resende *et al.*, 2014). En la propagación *in vitro* de *Vriesea incurvata* se encontró que al reducir la cantidad de nitrógeno en 75% del medio de cultivo y adicionar 60 g L⁻¹ de sacarosa, las plantas formaron un número mayor de raíces con longitud promedio de 5.9 cm (Sasamori *et al.*, 2016). En contraste, en *Vriesea heliconioides* se utilizó el medio MS con la mitad de concentración de sales para inducir 4.6 raíces por planta (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

length (1.5 cm) was obtained with 1.0 and 2.1 μM IBA (Table 4). We observed rooting from the second week of cultivation in all treatments. The roots were light white and after the third week they turned dark brown. *In vitro* rooting is induced by reducing the cytokinin concentrations of the culture medium and increasing those of auxins (Anis and Ahmad, 2016). The NAA and IBA are auxins used to induce rooting of plants *in vitro* (Uribe *et al.*, 2012). In bromeliads, both auxins have proved to favor plant rooting, although IAA is also used as a shoot inducer.

Rooting of *Nidularium innocentii* was 70% in liquid medium with 5.4 μM of NAA (Da silva *et al.*, 2012). In *N. concentrica*, rooting was the result of 3 μM of NAA at 30 d, and with 2, 3 and 4 μM of NAA, and 1 μM of IBA at 60 d (Rodrigues *et al.*, 2013). In *V. cacuminis* 1.5 and 4.5 μM of NAA induced 1.9 roots per plant after 90 d of cultivation (Resende *et al.*, 2014). At the *in vitro* propagation of *Vriesea incurvata* we found that by a 75% reducing in the nitrogen amount of the culture medium and by adding 60 g L⁻¹ of sucrose, plant roots increased with an average length of 5.9 cm (Sasamori *et al.*, 2016). In contrast, in *Vriesea heliconioides* we utilized the MS medium with half the concentration of salts to induce 4.6 roots per plant (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

Plant acclimatization

The highest growth in height (6.9 cm) occurred in 6.5 cm plants with peat+perlite substrate (1:1), as

Cuadro 4. Enraizamiento *in vitro* de plantas de *Tillandsia viridiflora* con ácido naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB) a las seis semanas de cultivo.

Table 4. *In vitro* rooting of *Tillandsia viridiflora* plants with naphthaleneacetic acid (NAA) and indole-3-butyric acid (IBA) at six weeks of culture.

ANA (μM)	AIB (μM)	Enraizamiento (%)	Raíces (Núm.)	Longitud de la raíz (cm)
0	0	70 a	0.8 c	1.2 b
1.0	0	75 a	2.4 a	0.9 c
2.1	0	15 b	0.3 c	0.7 d
0	1.0	85 a	1.5 b	1.5 a
0	2.1	95 a	2.0 ab	1.5 a

Medias con letra diferente por columna indican diferencia estadística ($p \leq 0.05$). ♦ Means with different letters per column indicate statistical difference ($p \leq 0.05$).

Aclimatación de plantas

El crecimiento mayor en altura (6.9 cm) se obtuvo en plantas de 6.5 cm con sustrato de turba+perlita (1:1) al igual que la mayor longitud de raíz con 2.8 cm (Figura 1F). La supervivencia fue de 100% en todos los tratamientos evaluados y el número de hojas mayor se presentó en plantas de 6.5 cm con sustrato de corteza de pino después de 11 semanas (Cuadro 5).

Los porcentajes de supervivencia obtenidos en *T. viridiflora* son similares con los hallados en la aclimatación de *Aechmea blanchetiana* y *A. distichantha*, para las cuales se obtuvieron 90 y 97%, respectivamente, en una mezcla de corteza de pino, carbón, turba y vermiculita, después de 60 d (Santa-Rosa *et al.*, 2013). En *V. reitzii* la supervivencia fue 95% en cascarilla de arroz carbonizado, corteza de pino y mezcla de comercial Plantmax® (2:2:1 v/v) después de 15 semanas (Dal Vesco *et al.*, 2014). En *V. cacuminis* se obtuvo 90% de supervivencia con sustrato comercial Plantmax Hortalicas HT® (Eucatex Agro, SP) (Resende *et al.*, 2014). Respecto a la altura inicial de las plantas para la aclimatación, se ha referido que es un factor restrictivo, ya que 3 cm se considera el tamaño mínimo para que sea exitosa (Guerra y Dal Vesco, 2010). En nuestro estudio se observó que las dos alturas de planta evaluadas (4.5 y 6.5 cm) resultaron óptimas para la supervivencia.

CONCLUSIONES

La regeneración de plantas de *Tillandsia viridiflora* se obtuvo con éxito a partir de plántulas *in vitro* cultivadas en medio Murashige-Skoog, con

well as the longest root length with 2.8 cm (Figure 1F). Survival was 100% in all the evaluated treatments and the highest number of leaves appeared in 6.5 cm tall plants with pine bark substrate after 11 weeks (Table 5).

The survival percentages obtained in *T. viridiflora* are similar to those found in the acclimatization of *Aechmea blanchetiana* and *A. distichantha*, 90 and 97%, respectively, in a mixture of pine bark, coal, peat and vermiculite, after 60 d (Santa-Rosa *et al.*, 2013). In *V. reitzii*, survival was 95% in charred rice husk, pine bark and commercial Plantmax® mix (2:2:1 v/v) after 15 weeks (Dal Vesco *et al.*, 2014). In *V. cacuminis*, survival was 90% with the commercial substrate Plantmax Hortalicas HT® (Eucatex Agro, SP) (Resende *et al.*, 2014). The initial height of the plants for acclimatization is referred as a limiting factor, since 3 cm is considered the minimum size to be successful (Guerra and Dal Vesco, 2010). In our study, we observed that the two evaluated plant heights (4.5 and 6.5 cm) were optimal for survival.

CONCLUSIONS

The successful regeneration of *Tillandsia viridiflora* plants resulted from *in vitro* seedlings grown in Murashige-Skoog medium, with 6-benzylaminopurine and naphthaleneacetic acid. The elongation of the plants was possible by adding gibberellic acid.

The acclimatization procedure guarantees the survival of the plants in peat+perlite and pine bark substrates. This protocol offers an alternative for the mass production of *T. viridiflora* plants that can

Cuadro 5. Aclimatación de plantas de *Tillandsia viridiflora* obtenidas *in vitro* con sustrato de turba+perlita (T+P) y corteza de pino (CP) después de 12 semanas.

Table 5. Acclimatization of *Tillandsia viridiflora* plants obtained *in vitro* with peat+perlite (T+P) and pine bark (CP) substrates after 12 weeks.

Tamaño de planta (cm) + Sustrato	Supervivencia (%)	Altura de planta (cm)	Longitud de raíz (cm)	Hojas (Núm.)
6.5 + CP	100 a	6.7 a	2.7 a	15.2 a
6.5 + T+P	100 a	6.9 a	2.8 a	14.2 a
4.5 + CP	100 a	4.2 b	1.9 b	14.9 a
4.5 + T+P	100 a	4.5 b	2.1 b	13.5 a

Medias con letra diferente por columna indican diferencia estadística (p≤0.05). ♦ Means with different letters per column indicate statistical difference (p≤0.05).

6-bencilaminopurina y ácido naftalenacético. El alargamiento se logró con la adición de ácido giberélico.

El procedimiento de aclimatación garantiza la supervivencia de las plantas en sustrato de turba+perlita y corteza de pino. Este protocolo ofrece una alternativa para la producción masiva de plantas de *T. viridiflora* que se pueden usar para la reintroducción, conservación y aprovechamiento comercial de la especie.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo por las instalaciones facilitadas para el desarrollo de la investigación y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca nacional (No. 461795) otorgada para postgrado.

LITERATURA CITADA

Anis, M., and N. Ahmad. 2016. Plant tissue culture: a journey from research to commercialization. *In*: Anis, M., and N. Ahmad (eds). Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement. Springer, Singapore. pp: 3-13.

Calderón-Arias, A. M., A. Restrepo-Gómez, y A. I. Urrea-Trujillo. 2011. Morfogénesis *in vitro* a partir de yemas apicales y bases de hojas de las especies de bromelias *Aechmea veitchii* y *Racinaea crispa*. *Actual Biol.* 33: 17-33.

Carvalho, V., D. S. Santos, and C. C. Nievola. 2014. *In vitro* storage under slow growth and *ex vitro* acclimatization of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea*. *South African J. Bot.* 92: 39-43.

Correa, S., and G. Zots. 2014. The influence of collecting date, temperature and moisture regimes on the germination of epiphytic bromeliads. *Seed Sci. Res.* 24:353-363.

Da Silva, A. L. L., J. Da Luz A, G. Bomfim A, D. Crystina C, M. Ruzza S, L. A. Biasi, G. Newton S, and C. R. Soccol. 2012. Micropropagation of *Nidularium innocentii* lem. and *Nidularium procerum* lindm (bromeliaceae). *Pak. J. Bot.* 44: 1095-1101.

Dal Vesco, L. L., R. Pescador, J. P. Corredor P, L. J. Welter, and M. P. Guerra. 2014. *In vitro* propagation of *Vriesea reitzii*, a native epiphyte bromeliad from the Atlantic rainforest. *Acta Scientiarum Biol. Sci.* 36: 271-278.

Espejo-Serna, A., y A. R. López-Ferrari. 2018. La familia Bromeliaceae en México. *Bot. Sci.* 96: 533-554.

Flores-Palacios, A. A. B. Bustamante-Molina, A. M. Corona-López, and S. Valencia-Díaz. 2015. Seed number, germination and longevity in wild dry forest *Tillandsia* species of horticultural value. *Scientia Hort.* 187: 72-79.

García-Suárez, M. D., V. Rico-Gray, N. Molina-Aceves, and H. Serrano. 2006. *In-vitro* germination and clonal propagation of endemic *Tillandsia califanii* Rauh (Bromeliaceae). *Selbyana* 27: 54-59.

Guerra, M. P., and L. L. Dal Vesco. 2010. Strategies for the micropropagation of bromeliads. *In*: Jain S. M., and S. J. Ochatt (eds). Protocols for *in vitro* Propagation of Ornamental Plants. Methods in Molecular Biology 589. Humana Press, New York. pp: 47-66.

be used for the reintroduction, conservation and commercial use of the species.

—End of the English version—



Hernández-Meneses, E., S. E. Rangel-Estrada, M. C. G. López-Peralta, A. Guerrero-Hilario, G. Ortiz-Gil, y L. Martínez-Bolaños. 2018. Germinación, viabilidad y regeneración *in vitro* de plantas de *Vriesea heliconioides* (Kunth) Hook. ex Walp. *Rev. Fitotec. Mex.* 41: 99-106.

Koh, Y. C., and F. T. Davies. 2001. Mutagénesis and *in vitro* culture of *Tillandsia fasciculata* Swartz var. *fasciculata* (Bromeliaceae). *Scientia Hort.* 87: 225-240.

Lavor, P., C. van den Berg, C. M. Jacobi, F. F. Carmo, and L. M. Versieux. 2014. Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the Iron Quadrangle, Espinhaço Range, Brazil. *Am. J. Bot.* 101: 1167-1175.

Manfio, C. E., S. Y. Motoike, C. C. de Paula, M. S. Valente, and C. G. Melo. 2010. Early selection of elite clones of an ornamental bromeliad *in vitro*. *Ciencia Rural* 40: 1537-1544.

Méndez, E. G., D. Mondragón, G. I. Cruz, y A. Vázquez. 2011. Usos de las bromelias en el estado de Oaxaca. Primera edición. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Oaxaca, México. 55 p.

Missagia, C. C. C., and M. A. S. Alves. 2015. The rate of visitation by *Amazilia fimbriata* (Apodiformes: Trochilidae) influences seed production in *Tillandsia stricta* (Bromeliaceae). *Zoologia* 32: 260-262.

Mollo, L., M. C. M. Martins, V. F. Oliveira, C. C. Nievola, and R. de C. L. Figueiredo-Ribeiro. 2011. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 107: 141-149.

Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Pinto, A. C. R., M. E. S. P. Demattê, D. M. M. Santos, J. C. Barbosa, and S. A. Creste. 2013. Growth regulators for *in vitro* propagation of *Tillandsia gardneri* (Bromeliaceae). *Acta Hort.* 1002: 51-57.

Pulido-Rueda, E. E., M. A. Milaneze-Gutierrez, and R. Negrelle. 2018. *In vitro* germination and growth of *Vriesea incurvata* Gaudich. (Bromeliaceae). *Acta Agron.* 67: 140-145.

Resende, C. F., C. Ribeiro, G. Camargo M, C. Q. Godoy S, V. Fernandes B, B. P Da Cruz, R. Camostrini F, and P. H. Pereira. 2014. *In vitro* culture of *Vriesea cacuminis* L.B. Sm. (Bromeliaceae): an endemic species of Ibitipoca State Park, MG, Brazil. *Iheringia, Série Botânica, Porto Alegre* 71: 55-61.

Rodrigues, J. P. M., E. R. Schimildt, R. S. Alexander, B. R. Santos, and G. C. Magevski. 2013. Effect of synthetic auxins on *in vitro* and *ex vitro* bromeliad rooting. *Pesquisa Agropec. Trop.* 43: 138-146.

- Santa-Rosa, S., F. V. D. Souza, Á. M. Vidal, C. A. S. Ledo, and J. R. F. de Santana. 2013. Micropropagation of the ornamental vulnerable bromeliads *Aechmea blanchetiana* and *Aechmea distichantha*. *Hortic. Bras.* 31: 112-118.
- SAS, Institute 2003. The SAS system for windows. Release 9.1. SAS Institute Cary, NC, USA. 329 p.
- Sasamori, M. H., D. E. Junior, and A. Droste. 2016. Low macronutrient concentrations benefit *in vitro* propagation of *Vriesea incurvata* (Bromeliaceae), an endemic species of the Atlantic Forest, Brazil. *Rodriguésia* 67: 1071-1081.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental– Especies nativas de México de flora y fauna silvestres– Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio– Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación 30 diciembre, 2010. http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf (Consulta: febrero 2017).
- Sheu, Y., A. S. Cunha-Machado, A. B. P. L. Gontijo, F. C. Favoreto, T. B. C. Soares, and F. D. Miranda. 2017. Genetic diversity of Bromeliaceae species from the Atlantic Forest. *Genetics Molecular Res.* 16: 1-8.
- Silveira, D. G., F. V. Duarte S, C. Regina P, A. da Silva S, C. A. da Silva L, and J. R. Ferreira. 2009. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52: 923-932.
- Uribe, M. E., J. Ulloa, C. Delaveau, K. Sáez, F. Muñoz, y P. Cartes. 2012. Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento *in vitro* de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana Bot.* 69: 105-112.
- Vázquez, N. B., J. R. García N, M. Flores C, S. D. Koch O, y A. Robledo P. 2014. Germinación y viabilidad de *Tillandsia macdougallii* y *Tillandsia violacea* (Bromeliaceae) con fines de aprovechamiento sustentable. *Ciencia Tecnol. Agrop. México* 2: 30-35.
- Zotz, G. 2013. The systematic distribution of vascular epiphytes - a critical update. *Bot. J. Linn Soc.* 171: 453-481.

CALIDAD POSCOSECHA DE 40 POBLACIONES DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) NATIVAS DE MÉXICO

POST-HARVEST QUALITY OF 40 COLLECTIONS OF TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.) NATIVE OF MEXICO

Ana María Magallanes-López¹, María Teresa Martínez-Damián¹, Jaime Sahagún-Castellanos¹, Laura Josefina Pérez-Flores²,
Iván Maryn Marín-Montes¹, Juan Enrique Rodríguez-Pérez^{1*}

¹Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. 26230. Chapingo, Estado de México. (erodriguezx@yahoo.com.mx). ²Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Avenida San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1ra Sección. C. P. 09340. CDMX. México.

RESUMEN

En la mejora de la calidad física, química y nutricional del fruto de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), con frecuencia se recurre a acervos silvestres con el fin de aprovechar su variación genética, lo cual genera la necesidad de identificar sus cualidades. El objetivo de la presente investigación fue caracterizar la calidad poscosecha de fruto de 40 poblaciones de tomate nativo de México, mediante el estudio de parámetros de calidad física, química y hedónica, para generar información que oriente su conservación y uso dentro del mejoramiento genético. Las accesiones se establecieron en condiciones de invernadero, en sistema hidropónico abierto con sustrato de arena volcánica, bajo un diseño experimental de bloques completos al azar, con cinco repeticiones. La calidad de fruto se evaluó mediante características físicas (peso, índice de redondez, porcentaje de pulpa y firmeza), químicas (contenido de sólidos solubles, ácidos orgánicos y vitamina C) y hedónicas (color, forma, aroma, sabor y jugosidad). Mediante un análisis multivariado de agrupamiento se detectaron cuatro grupos de accesiones; un análisis discriminante corroboró la pertinencia de dichos conjuntos y mostró que las agrupaciones se basaron principalmente en caracteres relativos a la calidad física y hedónica. Análisis de varianza y comparaciones de medias indicaron diferencias estadísticas entre grupos. Así, en las poblaciones se identificaron cualidades de interés con posibilidades de uso en el mejoramiento genético de la calidad poscosecha. La conservación eficiente, que mantenga la variación genética de las recolecciones evaluadas, puede lograrse con el resguardo de 62.5% de ellas.

ABSTRACT

In improving physical, chemical and nutritional quality of tomato fruit (*Solanum lycopersicum* L.), breeders often turn to wild stock to use its genetic variation. However, this generates the need to identify its qualities. The objective of this study was to characterize postharvest quality of the fruit of 40 native populations of Mexico through the study of physical, chemical and sensorial quality parameters to generate information to orient their conservation and use in genetic improvement. Accessions were established in a greenhouse in an open hydroponic system with volcanic sand as substrate, and under an experimental design of complete randomized blocks with five replications. Fruit quality was evaluated by assessment of physical (weight, roundness index, pulp percentage and firmness), chemical (contents of soluble solid, organic acids and vitamin C), and sensorial (color, shape, aroma, flavor and juiciness) characteristics. Using a multivariate cluster analysis, four groups of accessions were detected. A discriminant analysis corroborated the pertinence of these sets and showed that the groupings were based mainly on traits related to physical and sensorial quality. Analysis of variance and comparison of means indicated statistical differences between groups. Thus, qualities of interest with possibility of use in genetic improvement of postharvest quality were identified in the wild populations. Efficient conservation that can maintain genetic variation of the collections evaluated can be achieved by protecting 62.5% of them.

Key words: chemical quality, physical quality, hedonic quality, soluble solids, titratable acidity, vitamin C.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: febrero, 2019. Aprobado: mayo, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 779-xxx. 2020.

Palabras clave: calidad química, calidad física, calidad hedónica, sólidos solubles, acidez titulable, vitamina C.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es originario de la región andina de América del Sur, donde se encuentran diversas especies del género *Solanum*. Sin embargo, la hipótesis más aceptada sugiere que su domesticación ocurrió en México (Rick, 1986), debido a la amplia variabilidad observada en las poblaciones de este país (Peralta y Spooner, 2007). La conservación de las variedades de tomate autóctonas ha ocurrido a través de poblaciones semi-domesticadas y silvestres de agricultores tradicionales (Chávez-Servia *et al.*, 2011; Pacheco-Triste *et al.*, 2014; Ríos-Osorio *et al.*, 2014a). Sin embargo, la domesticación de plantas generó el incremento de la productividad, aunque de manera simultánea redujo la variación genética de los cultivos (Ladizinsky, 1998). Por esta razón, una práctica en el mejoramiento genético es recurrir a ancestros nativos con el propósito de identificar y recuperar caracteres de interés perdidos durante la selección y mejoramiento, en especial los asociados a las tolerancias adquiridas a través de su adaptación a condiciones abióticas adversas (Zamir, 2001), a patógenos en pre y poscosecha (Bao *et al.*, 2007), y a las involucradas en la calidad de fruto.

No obstante, al emplear materiales nativos de manera directa como progenitores, por lo general hay efectos negativos sobre la adaptación, estabilidad y producción de los cultivos, debido a características inadecuadas para su manejo agronómico en condiciones de monocultivo (Ríos-Osorio *et al.*, 2014b). Asimismo, una vida de anaquel corta dificulta su comercialización y uso en el mejoramiento genético (Chaib *et al.*, 2007). Por ello se recurre de manera enfática sólo a caracteres que aportan ventajas a las variedades comerciales (Bernacchi *et al.*, 1998).

La preferencia notoria y la calidad nutraceutica del fruto de tomate nativo y silvestre es conferida por caracteres como las concentraciones de vitamina C, licopeno, ácidos orgánicos, sólidos solubles y compuestos antioxidantes (Juárez-López *et al.*, 2009). Asimismo, muestran características de fruto interesantes como forma, color, sabor, calidad poscosecha, culinaria y nutraceutica, por lo que son una fuente valiosa de germoplasma para el mejoramiento

INTRODUCTION

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) originated in the Andes region of South America where several species of the *Solanum* genus can be found. However, the most accepted hypothesis suggests that it was domesticated in Mexico (Rick, 1986) because of the wide variability observed in populations of this country (Peralta and Spooner, 2007). Native tomato varieties have been conserved by traditional farmers in semidomesticated and wild populations (Chávez-Servia *et al.*, 2011; Pacheco-Triste *et al.*, 2014; Ríos-Osorio *et al.*, 2014a). Domestication generated an increase in productivity, although simultaneously genetic variation of the crop decreased (Ladizinsky, 1998). For this reason, breeding practices include study of native ancestors to identify and recover traits of interest that were lost during selection and breeding, especially those associated with tolerance acquired through adaptation to adverse abiotic conditions (Zamir, 2001), pathogens in pre and postharvest (Bao *et al.*, 2007), and those involved in fruit quality.

Nevertheless, direct use of native materials as progenitors can have negative effects on crop adaptation, stability and production due to characteristics that are not suitable for agronomic management under monocropping conditions (Ríos-Osorio *et al.*, 2014b). Moreover, a short shelf life makes commercialization and use in genetic improvement difficult (Chaib *et al.*, 2007). For this reason, emphatically, only traits that contribute advantages to commercial varieties are used (Bernacchi *et al.*, 1998).

The marked preference and nutraceutical fruit quality of native and wild tomato is conferred by traits such as concentrations of vitamin C, lycopene, organic acids, soluble solids, and antioxidant compounds (Juárez-López *et al.*, 2009). They also exhibit interesting fruit characteristics such as shape, color, flavor, and postharvest, culinary and nutraceutical quality, and so they are a valuable source of germplasm for breeding (Carrillo-Rodríguez and Chávez-Servia, 2010).

To achieve adequate use of native and wild tomato germplasm, it is necessary to characterize its qualities of anthropocentric interest and its genetic variation (Marín-Montes *et al.*, 2016). These topics were approached in research that includes studies

genético (Carrillo-Rodríguez y Chávez-Servia, 2010; Crisanto-Juárez *et al.*, 2010).

Para lograr el aprovechamiento adecuado del germoplasma nativo y silvestre de tomate se requiere caracterizar sus cualidades de interés antropocéntrico y la variación genética de las mismas (Marín-Montes *et al.*, 2016). El estudio de estos tópicos se realizó en varios estudios que incluyen caracterizaciones de sistemas de producción (Ríos-Osorio *et al.*, 2014b), rendimiento de fruto (Urrieta-Velázquez *et al.*, 2012; Salgado-Meraz *et al.*, 2018), diversidad genética con marcadores moleculares (Marín-Montes *et al.*, 2016; Marín-Montes *et al.*, 2019), clasificación morfológica (Álvarez-Hernández *et al.*, 2009; Vásquez-Ortiz *et al.*, 2010; Carrillo-Rodríguez y Chávez-Servia, 2010; Chávez-Servia *et al.*, 2011; Ríos-Osorio *et al.*, 2014a; Marín-Montes *et al.*, 2016; Marín-Montes *et al.*, 2019), resistencia a nematodos (Cervantes-Moreno *et al.*, 2014), preferencia de insectos fitófagos (Álvarez-Hernández *et al.*, 2009), uso como portainjertos (Touré *et al.*, 2010; Velasco-Alvarado *et al.*, 2017), así como cualidades del fruto físicas (forma, tamaño, color, firmeza) (Urrieta-Velázquez *et al.*, 2012; Crisanto-Juárez *et al.*, 2010; Ríos-Osorio *et al.*, 2014a; Tochihiuitl *et al.*, 2017), químicas (composición química y nutraceutica) (Juárez-López *et al.*, 2009; Chávez-Servia *et al.*, 2011; Berrospe-Ochoa *et al.*, 2018; Figueroa-Cares *et al.*, 2018; Vela-Hinojosa *et al.*, 2018a) y características de cutícula del fruto (Vela-Hinojosa *et al.*, 2018b).

Sin embargo, estos esfuerzos aún son escasos ante la vasta diversidad que presenta esta especie en México. Los bancos de germoplasma nacionales hasta 2012, resguardaban 1,161 accesiones del género *Lycopersicum* (Molina y Cordova, 2006; Lobato *et al.*, 2012), de las cuales 72% proceden de los estados de Jalisco y Puebla (Lobato *et al.*, 2012), haciendo falta explorar regiones extensas con amplia presencia de germoplasma. Además, sólo 46% de las accesiones se ha caracterizada mediante descriptores morfológicos (Molina y Cordova, 2006), por lo que la atención a caracteres de interés agronómico asociadas a resistencias a factores bióticos y abióticos y la calidad de fruto aún es insuficiente.

Un uso relevante derivado de la información generada a partir del estudio de las cualidades de poblaciones silvestres de tomate es el asociado con la eficiencia de su conservación al permitir evitar la

on characterizations of production systems (Ríos-Osorio *et al.*, 2014b), fruit yield (Salgado-Meraz *et al.*, 2018), genetic diversity with molecular markers (Marín-Montes *et al.*, 2016; Marín-Montes *et al.*, 2019), morphological classification (Álvarez-Hernández *et al.*, 2009; Vásquez-Ortiz *et al.*, 2010; Chávez-Servia *et al.*, 2011; Ríos-Osorio *et al.*, 2014a; Marín-Montes *et al.*, 2016; Marín-Montes *et al.*, 2019), resistance to nematodes (Cervantes-Moreno *et al.*, 2014), preference of phytophagous insects (Álvarez-Hernández *et al.*, 2009), use as root stock (Velasco-Alvarado *et al.*, 2017), as well as physical fruit qualities (shape, size, color, firmness) (Urrieta-Velázquez *et al.*, 2012; Crisanto-Juárez *et al.*, 2010; Ríos-Osorio *et al.*, 2014a; Tochihiuitl *et al.*, 2017), chemical characteristics (chemical and nutraceutical composition) (Juárez-López *et al.*, 2009; Chávez-Servia *et al.*, 2011; Berrospe-Ochoa *et al.*, 2018; Figueroa-Cares *et al.*, 2018; Vela-Hinojosa *et al.*, 2018a), organoleptic traits (Vela-Hinojosa *et al.*, 2018a), and characteristics of fruit cuticle (Vela-Hinojosa *et al.*, 2018b).

These efforts are scarce compared to the vast diversity of this species in Mexico. National germplasm banks, up to 2012, had 1,161 accessions of the genus *Lycopersicum* (Molina and Cordova, 2006; Lobato *et al.*, 2012), of which 72% were from the states of Jalisco and Puebla (Lobato *et al.*, 2012), making it evident that it is necessary to explore extensive regions with broad presence of germplasm. Only 46% of these accessions are characterized by morphological descriptors (Molina and Cordova, 2006); thus, attention to traits of agronomic interest associated with biotic and abiotic resistance factors and fruit quality is still insufficient.

A relevant use derived from study of the qualities of wild tomato populations is that associated with the efficiency of their conservation in germplasm banks when attempting to avoid duplicating accessions with similar genetic characteristics. Marín-Montes *et al.* (2016), using morphological and molecular descriptions of the populations, were able to decrease the number of accessions to be conserved by 33%. Thus, in the face of the lack of characterization of nearly 80% of the conserved wild populations (Bastias, 2008) and the areas pending to be explored in search of this resource, adequate methods should be applied to achieve efficient conservation.

duplicidad de accesiones con características genéticas similares en bancos de germoplasma. Marín-Montes *et al.* (2016), a partir de descripciones morfológicas y moleculares de las poblaciones, lograron disminuir 33% el número de accesiones a conservar. Así, ante la falta de la caracterización de alrededor de 80% de las poblaciones silvestres conservadas (Bastias, 2008) y de las áreas pendientes a explorar en busca de este recurso, se deben aplicar métodos adecuados para lograr una conservación eficiente.

El objetivo de la presente investigación fue caracterizar la calidad poscosecha de fruto de 40 poblaciones de tomate nativo de México, mediante el estudio de parámetros de calidad física, química y hedónica para generar información que oriente su conservación y uso dentro del mejoramiento genético. Lo anterior bajo el supuesto de que en las poblaciones nativas y silvestres la variación genética es aun de enorme magnitud porque no se han sometidas a esquemas intensivos de selección, lo cual permitirá la identificación de genotipos con atributos de calidad sobresaliente.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se hizo en 40 accesiones nativas provenientes de nueve estados de México, proporcionadas por el Programa de Mejoramiento Genético de Tomate de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH). De ellas, 11 fueron recolectadas en Oaxaca (4, 17, 19, 20, 21, 22, 27, 29, 32, 45, 46), ocho en Chiapas (6, 8, 24, 33, 36, 37, 50, 58), seis en Puebla (2, 3, 16, 48, 49, 56), cinco en Veracruz (5, 25, 26, 31, 51), dos en Tabasco (1, 53), una en Guerrero (60), una en Hidalgo (55), una en Jalisco (40) y una en San Luis Potosí (11). Además, se evaluaron cuatro accesiones de origen desconocido (28, 54, 62, 63).

El cultivo se desarrolló en un invernadero de tipo "apertura total" (Full Vent) localizado en Chapingo, México (19° 29' N, 98° 53' O y 2240 msnm), con cubierta de plástico blanco de 70% de transmitancia. Un sistema hidropónico abierto se usó con la solución nutritiva propuesta por Cadahía *et al.* (2005). El sustrato fue espuma volcánica (piedra basáltica), contenido en macetas de polipropileno de 15 L de capacidad. La densidad de plantación fue equivalente a 3.7 plantas m⁻². Las evaluaciones de calidad se realizaron en el laboratorio de Fisiología de Frutales del Departamento de Fitotecnia de UACH. La unidad experimental fue 10 frutos cosechados en grado de madurez 6 (madurez de consumo, completamente rojos), según la escala propuesta por el USDA (1975). El diseño experimental fue de bloques completos al azar con cinco repeticiones.

The objective of this study was to characterize postharvest quality of fruit from 40 populations of native tomato of Mexico through study of physical, chemical and hedonic quality parameters to generate information to orient their conservation and use in genetic improvement. The hypothesis was that in native and wild populations genetic variation is of enormous magnitude because they have not been subjected to intensive selection schemes, a situation that will permit identification of genotypes with outstanding quality attributes.

MATERIALS AND METHODS

Forty native accessions from nine states of Mexico provided by the Program of Tomato Genetic Improvement of the Universidad Autónoma Chapingo (UACH) were studied. Of these accessions, 11 were collected in Oaxaca (4, 17, 19, 20, 21, 22, 27, 29, 32, 45, 46), eight in Chiapas (6, 8, 24, 33, 36, 37, 50, 58), six in Puebla (2, 3, 16, 48, 49, 56), five in Veracruz (5, 25, 26, 31, 51), two in Tabasco (1, 53), one in Guerrero (60), one in Hidalgo (55), one in Jalisco (40) and one in San Luis Potosí (11). In addition, four accessions of unknown origin (28, 54, 62, 63) were also evaluated.

The plants were grown in a full vent greenhouse located in Chapingo, Mexico (19° 29' N, 98° 53' W and 2240 m altitude). The white plastic covering allows 70% transmittance. An open hydroponic system was used with the nutrient solution proposed by Cadahía *et al.* (2005). The substrate was volcanic pumice (basalt) in 15 L polypropylene pots. Plantation density was equivalent to 3.7 plants m⁻². Quality assessments were carried out in the Fruit Physiology Laboratory of the Department of Plant Science at UACH. The experimental unit was 10 fruits harvested at ripening stage 6 (consumption ripeness, completely red), according to the scale proposed by the USDA (1975). The experimental design was complete randomized blocks with five replications.

Evaluated traits

Fruit (FW) and pulp (PW) weight (g) was obtained with an electronic digital balance OHAUS® model Scout Pro SP2001 (USA). Fruit polar (PD) and equatorial (ED) diameters (mm) were determined with a digital Vernier TRUPER® (CALDI-6MP, Mexico). Fruit roundness index was calculated with the quotient PD/ED. Pulp percentage, relative to total fruit weight, was determined with the formula: [(FW-PW) × 100] / FW. The number of locules (NL) was counted in fruit sectioned at the equator.

Caracteres evaluados

El peso de fruto (PF) y de pulpa (PP) en g se registraron con una balanza electrónica digital marca OHAUS® modelo Scout Pro SP2001 (USA). El diámetro polar (DP) y el ecuatorial (DE) del fruto (en mm) se determinaron con vernier digital marca TRUPER® (CALDI-6MP, México). El índice de redondez del fruto se calculó con el cociente DP/DE. El porcentaje de pulpa con respecto al peso total del fruto se determinó con la fórmula: $[(PF-PP) \times 100] / PF$. El número de lóculos (NL) se registró mediante un corte ecuatorial del fruto.

El color de la epidermis de fruto se midió con un colorímetro portátil ColorTec-PMC (USA), basado en los parámetros L, a y b de la escala tridimensional del sistema CIELAB (Hunt y Pointer, 2011) y se determinaron: la luminosidad (L), el croma o saturación $[(a^2+b^2)^{1/2}]$ y el tono o ángulo Hue $[H=\tan^{-1}(b/a)]$.

La firmeza (N) se registró en la zona ecuatorial de frutos sin epidermis con texturómetro digital compact Gauge marca Mecmesin® CE (Mecmesin, España), mediante un puntal en forma de cono de diámetro de 9 mm. Dicho carácter refleja la fuerza aplicada hasta la penetración del puntal.

El contenido de sólidos solubles (°Brix) del jugo de frutos se midió con refractómetro digital marca Atago, modelo PAL-1 (México) y escala de 0 a 53%. La concentración de vitamina C (VC, en mg·100·g⁻¹ de peso fresco) se calculó de acuerdo con la metodología establecida por la AOAC (1990); para ello, se homogeneizaron 5 mL de jugo con 50 mL de una solución de ácido oxálico (0.5 %), de la cual se tomó una alícuota de 5 mL y se tituló con solución Tillman (0.01%). La concentración se determinó a partir del gasto generado y una curva tipo construida con concentraciones conocidas de ácido ascórbico.

La acidez titulable (AT, en % de ácido cítrico) se cuantificó con la técnica de la AOAC (1990). Se homogenizaron 10 g de pulpa con 50 mL de agua destilada, se tomó una alícuota de 10 mL, se tituló con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N y se usó timolftaleína como indicador. Para obtener el porcentaje de ácido cítrico se empleó la fórmula: $AT = (mL\ NaOH \times N \times Meq\ ácido \times V \times 100) / (\text{peso muestra} \times \text{alícuota})$, donde: AT es el contenido de ácido cítrico expresado en porcentaje, N es la normalidad del NaOH, V es el volumen total de la muestra en mL después de ser licuada y Meq ácido son los miliequivalentes del ácido presente en mayor proporción (0.064 para ácido cítrico).

La calidad hedónica del fruto se determinó mediante un panel de evaluación de diez personas, quienes determinaron sensorialmente su afinidad hacia: color, forma, aroma, sabor, jugosidad, textura y cantidad de semillas. Cada variable recibió un número del 1 al 5: 1 desagradable, y 5 muy agradable.

Fruit epidermis color was measured with a portable colorimeter ColorTec-PMC (USA), based on the parameters L, a and b of the tridimensional scale of the CIELAB system (Hunt and Pointer, 2011), and luminosity (L), chroma or saturation $[(a^2+b^2)^{1/2}]$ and hue or Hue angle $[H=\tan^{-1}(b/a)]$ were determined.

Firmness (N) was measured in the equatorial zone of fruits without epidermis with a compact digital texturometer gauge Mecmesin® CE (Mecmesin, Spain) with a 9 mm diameter conical probe. This trait reflects the force applied by the probe in terms of its penetration.

Content of soluble solids (°Brix) in fruit juice was measured with digital refractometer Atago, model PAL-1 (Mexico) with a scale from 0 to 53%. Vitamin C (VC) concentration (mg·100·g⁻¹ fresh weight) was calculated following the methodology of AOAC (1990). Five mL juice was homogenized with 50 mL oxalic acid solution (0.5%), and a 5 mL aliquot was titrated with Tillman solution (0.01%). The concentration was determined from the titres and a type curve constructed with known ascorbic acid concentrations.

Titrateable acidity (TA, % citric acid) was quantified with the AOAC (1990) technique: 10 g pulp was homogenized with 50 mL distilled water; a 10 mL aliquot was titrated with a solution of 0.1 N sodium hydroxide and thymolphthalein as an indicator. For percentage of citric acid, the formula $TA = (mL\ NaOH \times N \times \text{acid Meq} \times V \times 100) / (\text{sample weight} \times \text{aliquot})$ was used, where TA is the content of citric acid expressed in percentage, N is the normality of NaOH, V is the total volume of the sample in mL after liquification, and acid Meq is milliequivalents of the acid present in higher proportion (0.064 for citric acid).

Sensorial fruit quality was determined by an evaluation panel of ten people who determined their sensorial preferences for fruit color, shape, aroma, flavor, juiciness, texture and quantity of seeds. Each variable received a score from 1 to 5: 1 was unpleasant and 5 highly pleasant.

Statistical analysis

Informative variables were selected by analysis of successive covariances (Johnson, 1998) with which the cluster analysis was performed with standardized data and squared Euclidian distances. In the construction of the dendrogram, the Ward minimum variance algorithm was used. Height of the cut to define groups was determined by cubic grouping criteria (SAS Institute, 1983) and the Hotelling pseudo statistic t^2 (1951).

A discriminant analysis was then performed; the categoric variable corresponded to groups generated in the previous analysis to corroborate pertinence and determine the variables

Análisis estadístico

La selección de variables informativas se hizo mediante análisis de covarianzas sucesivos (Johnson, 1998), con las cuales se efectuó un análisis de agrupamiento con datos estandarizados y distancias euclidianas cuadradas. En la construcción del dendrograma se utilizó el algoritmo de mínima varianza de Ward. La altura de corte para definir grupos se determinó mediante el criterio cúbico de agrupamiento (SAS Institute, 1983) y la pseudoestadística t^2 de Hotelling (1951).

Después se realizó un análisis discriminante, el cual consideró como variable categórica a los grupos generados en el análisis anterior para corroborar su pertinencia y determinar las variables responsables de las agrupaciones. A partir de las funciones discriminantes se realizó la prueba de sustitución (Johnson, 1998) para verificar la pertenencia de las observaciones a las agrupaciones. Al final, se efectuaron análisis de varianza y comparaciones de promedios con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para verificar diferencias estadísticas en los caracteres evaluados en función de los grupos identificados. Esos análisis se realizaron con el programa SAS versión 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de variables

Los análisis de covarianza realizados con 22 caracteres evaluados identificaron a 12 de ellos con la mayor capacidad de discriminación de accesiones, de manera simultánea y con baja asociación entre ellos (baja multicolinealidad). Dichas variables involucraron al tamaño y forma de fruto (peso de fruto, índice de redondez, porcentaje de pulpa), atributos de calidad intrínseca (firmeza, sólidos solubles, vitamina C, acidez titulable) y variables asociadas a la preferencia visual y organoléptica del consumidor (color, forma, aroma, sabor y jugosidad). Los demás caracteres no se usaron para realizar los análisis multivariados al no tener capacidad para diferenciar accesiones, o bien, por su alta asociación lineal con otros caracteres.

En la caracterización de 40 poblaciones de tomate nativo mexicano realizada por Bonilla-Barrientos *et al.* (2014), la concentración de sólidos solubles, la firmeza y el número de lóculos, tuvieron importancia fundamental en la discriminación de grupos. Dichos caracteres también fueron de gran utilidad para los propósitos de la presente investigación. Crisanto-Juárez *et al.* (2010) diferenciaron 17 recolectas de tomates silvestres de Oaxaca, México, a partir de los

responsable for the grouping. With the discriminant functions, the substitution test was performed (Johnson, 1998) to verify observation pertinence to the clusters. An analysis of variance and a Tukey test of comparison of means ($p \leq 0.05$) were performed to verify statistical differences among the evaluated traits in function of the identified groups. These analyses were carried out in SAS, version 9.0.

RESULTS AND DISCUSSION

Selection of variables

The analyses of successive covariances performed with 22 evaluated traits identified 12 that had higher capacity to discriminate the accessions, simultaneously and with low association among themselves (low multicollinearity). These variables involved fruit size and shape (fruit weight, roundness index, pulp percentage), intrinsic quality attributes (firmness, soluble solids, vitamin C, titratable acidity) and associated variables with visual and organoleptic consumer preference (color, shape, aroma, flavor, juiciness). The rest of the traits were not used for the multivariate analyses because they did not have the capacity to differentiate accessions, or because of their high linear association with other traits.

In the characterization of 40 native Mexican tomato populations by Bonilla-Barrientos *et al.* (2014), concentration of soluble solids, firmness and number of locules had fundamental importance in discriminating groups. These traits were also useful for the aims of our study. Crisanto-Juárez *et al.* (2010) differentiated 17 collections of wild tomatoes of Oaxaca, Mexico, using soluble solids, pH, titratable acidity, and contents of lycopene and reducing sugars.

Cluster analysis

The dendrogram of the cluster analysis carried out with the 12 chosen variables is shown in Figure 1. Height of the cut corresponded to four groups with a semi-partial r^2 of 0.02, defined with the cubic grouping criterion (SAS Institute, 1983) and the Hotelling pseudo t^2 (1951). The number of collections included in the four clusters were 21, 7, 8 and 4, respectively. Like Marín-Montes *et al.* (2016), this study used the Ward minimum variance method because, when assessing genotype variation, this

sólidos solubles, pH, acidez titulable, contenidos de licopeno y azúcares reductores.

Análisis de agrupamiento

El dendrograma del análisis de agrupamiento realizado con las 12 variables elegidas se muestra en la Figura 1. La altura de corte correspondió a cuatro grupos con r^2 semiparcial de 0.02, definida a partir del criterio cúbico de agrupamiento (SAS Institute, 1983) y de la pseudo t^2 de Hotelling (1951). El número de recolectas incluidas en los grupos fueron 21, 7, 8 y 4, respectivamente. La presente investigación utilizó el método de mínima varianza de Ward, al igual que Crisanto-Juárez *et al.* (2010) y Marín-Montes *et al.* (2016), porque este método al valorar la variación existente de los genotipos tiene como ventaja el reducir la presencia de individuos atípicos dentro de las agrupaciones (Núñez-Colín y Escobedo-López, 2011). El citado método aplicado contrasta con Pacheco-Triste *et al.* (2014) y Bonilla-Barrientos *et al.* (2014), quienes emplearon el método de agrupación de pares no ponderados con la media aritmética (UPGMA, unweighted pair grouping method with arithmetic-mean) y con Chávez-Servia *et al.* (2011), que recurrieron al de ligamiento promedio.

method has the advantage of reducing the presence of atypical individuals in the clusters (Núñez-Colín and Escobedo-López, 2011). In contrast, Pacheco-Triste *et al.* (2014) and Bonilla-Barrientos *et al.* (2014) used the unweighted pair grouping method with arithmetic-mean method (UPGMA), while Chávez-Servia *et al.* (2011) used the method of average linkage.

Discriminant analysis

In the discriminant analysis, the sets of collections defined by the previous analysis were used as categorical variable, generating two discriminant functions (VD1 and VD2), which described 99% of the variability of the data, with individual variations of 89 and 10%, respectively, both different from zero ($p \leq 0.01$). The multivariate distances between group centroids were different from zero ($p \leq 0.01$), suggesting that the four groups of collections are contrasting.

The values (sign and magnitude) included in the Eigen vectors (Table 1) determined the influence of the original variables on the previous classification. High values of VD1 identified accessions with higher expression of fruit weight, pulp percentage

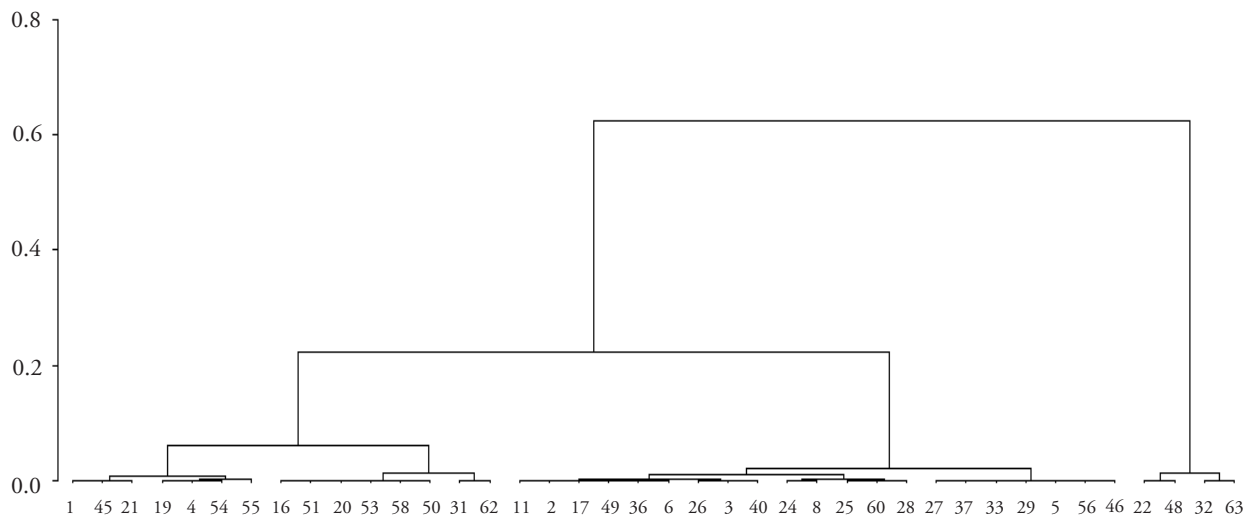


Figura 1. Dendrograma jerárquico de 40 variedades de tomate nativo, obtenido mediante distancias euclidianas cuadradas y la técnica de varianza mínima de Ward.

Figure 1. Hierarchical dendrogram of 40 native tomato varieties, obtained with squared Euclidean distances and the Ward minimum variance technique.

Análisis discriminante

En el análisis discriminante se usó como variable categórica los conjuntos de recolectas definidos por el análisis anterior, mediante el cual se generaron dos funciones discriminantes (VD1 y VD2) que describieron 99% de la variabilidad de los datos, con variaciones individuales de 89 y 10% respectivamente, ambas diferentes de cero ($p \leq 0.01$). Las distancias multivariadas entre centroides de grupos fueron diferentes de cero ($p \leq 0.01$), lo cual sugiere que los cuatro grupos de recolectas son contrastantes.

Los valores (signo y magnitud) incluidos en los vectores propios (Cuadro 1) determinaron la influencia de las variables originales sobre la clasificación anterior. Valores altos de VD1 identificaron accesiones con expresión mayor del peso de fruto, porcentaje de pulpa y firmeza, aunque baja concentración de sólidos solubles, ácidos orgánicos (acidez titulable) y vitamina C; y viceversa. Aquí destaca la asociación inversa entre la calidad intrínseca con la firmeza, porcentaje de pulpa y peso de fruto.

En forma similar, otras investigaciones determinaron correlaciones negativas entre el tamaño de fruto y la concentración de sólidos solubles (Ibarbia y Lambeth, 1971), e incluso con atributos de tipo genético (Goldenberg y von der Pahlen, 1966). A pesar de ello, se identificaron regiones cromosómicas provenientes de especies silvestres que permiten

and firmness, although they had low concentrations of soluble solids, organic acids (titratable acidity) and vitamin C, and *vice versa*. Here, the inverse association of intrinsic quality with firmness, pulp percentage and fruit weight is remarkable.

In a similar way, Ibarbia and Lambeth (1971) determined negative correlations between fruit size and concentration of soluble solids, while Goldenberg and von der Pahlen (1966) found negative correlations even with genetic attributes. Despite this, chromosome regions from wild species were identified that allow increasing soluble solids with no substantial demerit to fruit size when associated with dry matter accumulation, cell division and cell wall synthesis without modifying metabolism of sugars and organic acids (Bertin *et al.*, 2009).

VD2 was associated positively with the sensorial traits of color, shape and aroma (Table 2); high VD2 values always corresponded to collections that had higher acceptance by the evaluators, and *vice versa*.

Figure 2 represents the 40 populations defined with VD1 and VD2 values, comprehending 99% of the information considered in the matrix of analyzed data.

The double substitution test indicated that none of the populations had to be relocated to a different group, indicating that the obtained groups contained homogenous populations within groups and heterogeneous between groups. Therefore, the

Cuadro 1. Vectores propios y funciones discriminantes de cuatro grupos de tomates nativos definidos con caracteres de calidad de fruto.

Table 1. Eigen vectors and discriminant functions of four native tomato groups defined by fruit quality traits.

Variable	Vector propio		Función discriminante	
	VD1	VD2	VD1	VD2
Constante			-237.624	-304.329
Peso	0.977	0.108	1.094	2.109
Índice de redondez	0.302	0.014	-5.909	-9.841
Porcentaje de pulpa	0.680	-0.601	1.597	2.186
Firmeza	0.556	0.023	67.663	84.574
Sólidos solubles totales	-0.601	0.141	8.535	7.313
Acidez titulable	-0.563	0.075	60.284	28.979
Vitamina C	-0.507	0.083	220.369	331.122
Color hedónico	-0.380	0.534	28.923	36.806
Forma hedónica	-0.281	0.775	6.417	-4.383
Aroma hedónico	0.107	0.431	-2.632	-6.188
Sabor hedónico	0.257	0.101	8.192	7.756
Jugosidad hedónica	0.359	0.286	19.092	17.677

el incremento de los sólidos solubles, sin demérito substancial del tamaño de fruto, al asociarse con la acumulación de materia seca, la división celular y la síntesis de pared celular, sin modificar el metabolismo de azúcares y ácidos orgánicos (Bertin *et al.*, 2009).

La VD2, se asoció en forma positiva con los caracteres sensoriales de color, forma y aroma (Cuadro 1), porque valores altos de VD2 correspondieron a recolectas con mayor aceptación por los evaluadores y viceversa.

La Figura 2 representa a las 40 poblaciones definidas a partir de los valores de VD1 y VD2, la cual comprende 99% de la información considerada en la matriz de datos analizados.

La prueba de doble sustitución indicó que ninguna de las poblaciones debió reubicarse en un

grouping generated by the previous analyses and described in Table 2 was considered adequate.

Analysis of variance

The analyses of variance confirmed differences ($p \leq 0.05$) in 13 traits among the groups. No statistical differences were detected in roundness index, fruit shape, L, chroma, Hue angle, or sensorial variables of flavor, juiciness and texture. The comparison of means (Table 3) agrees with the results of the discriminant analysis; the variables that differentiated the groups of populations were those of higher discriminatory capacity. These significant differences evidence high variability among the groups (Vásquez-Ortiz *et al.*, 2010).

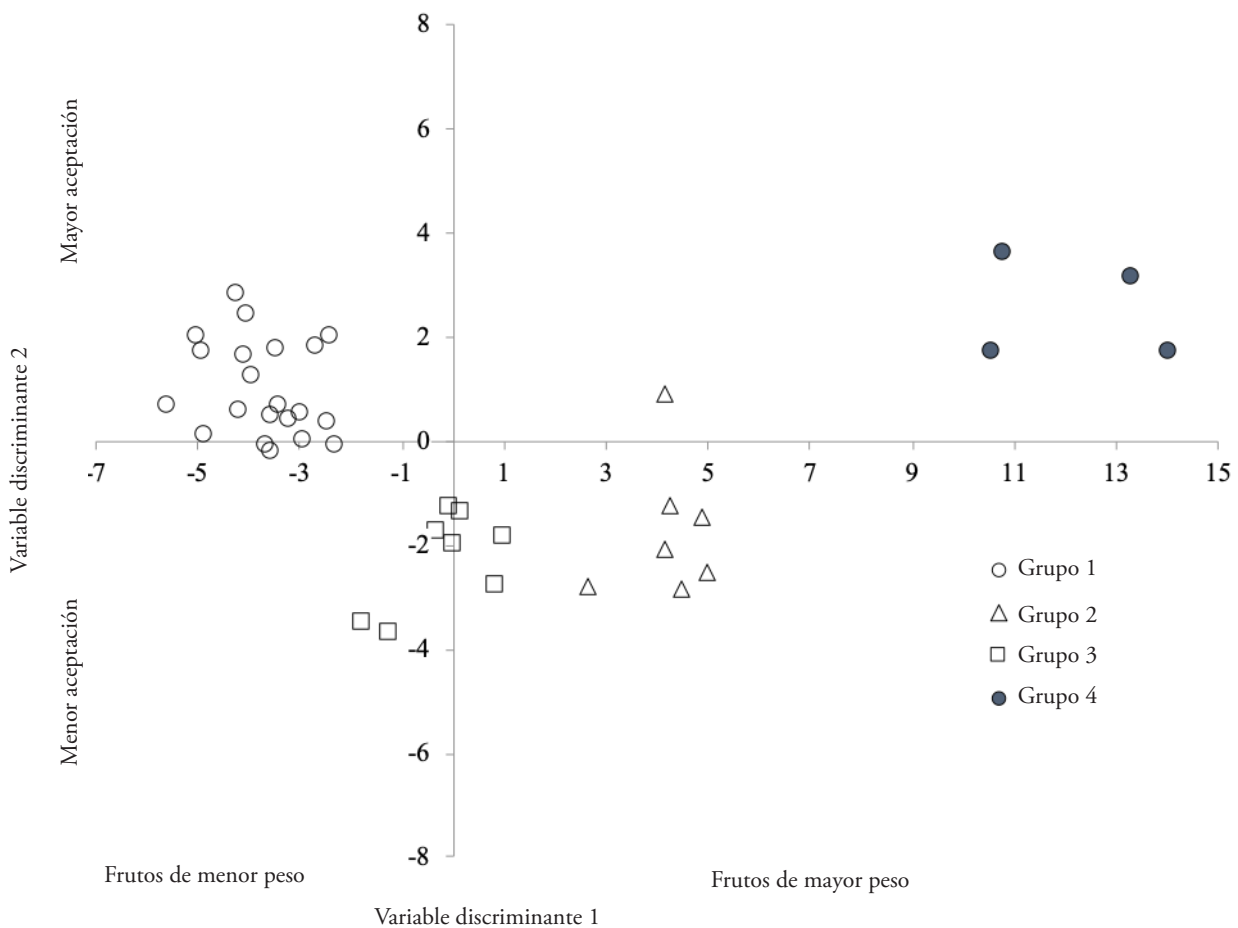


Figura 2. Representación gráfica de la agrupación por variables discriminantes de 40 poblaciones de tomate nativo de acuerdo con variables de calidad de fruto.

Figure 2. Graphic representation of grouping by discriminant variables of 40 populations of native tomato by fruit quality variables.

grupo diferente al propuesto. Los resultados de dichos análisis indican que los grupos obtenidos contienen poblaciones homogéneas dentro de ellos, pero heterogéneas entre grupos, por lo cual se consideró adecuada la agrupación descrita en el Cuadro 2, realizada a partir de análisis previos.

Análisis de varianza

Los análisis de varianza confirmaron diferencias ($p \leq 0.05$) entre grupos en trece caracteres. No se detectaron diferencias estadísticas en índice de redondez, forma de fruto, L, croma, ángulo Hue, y las variables sensoriales de sabor, jugosidad y textura. Las comparaciones de medias (Cuadro 3), concuerdan con los resultados del análisis discriminante porque las variables que se diferenciaron entre grupos de poblaciones fueron las de mayor capacidad discriminativa. Dichas diferencias significativas evidencian la alta variabilidad entre los grupos (Vásquez-Ortiz *et al.*, 2010).

Descripción de grupos

Los análisis de agrupamiento, discriminante y las comparaciones de promedios, los grupos reflejaron las siguientes características en los frutos.

Description of groups

The cluster and discriminant analyses and comparison of means and groups highlighted the following fruit characteristics.

Group 1 included 21 populations, around 50% of those examined. Of these populations, 19 have round fruits and two have kidney-shaped fruits. They are smaller ($p \leq 0.05$) in weight, diameter and length. Also, they have the lowest percentage of pulp ($p \leq 0.05$). In contrast, as detected by the discriminant analysis, the genotypes of this group have higher ($p \leq 0.05$) concentrations of soluble solids, organic acids and vitamin C. Moreover, they have better acceptance due to their color, shape and aroma ($p \leq 0.05$).

Group 2 was made up of seven populations, four of which have kidney-shaped fruits and the rest round fruits. Fruit size was intermediate, larger ($p \leq 0.05$) than fruits of Groups 1 and 3. Except for one collection, this group has low sensorial acceptance. Pulp percentage, firmness and vitamin C content were among the highest values ($p \leq 0.05$).

Group 3 comprises seven populations with kidney-shaped fruit and one with long fruit. Fruit size was medium with low weight, firmness and pulp percentage. In contrast, they had high contents of

Cuadro 2. Grupos definidos en 40 poblaciones de tomate, por variables de calidad de fruto.
Table 2. Groups defined in 40 tomato populations by fruit quality variables.

Grupo	Accesión	Origen	Características de grupo
1 (21 colectas)	11, 2, 17, 49, 36, 6, 26, 3, 40, 24, 8, 25, 60, 28, 27, 37, 33, 29, 5, 56, 46	1 San Luis Potosí 1 Guerrero 3 Puebla 3 Veracruz 4 Oaxaca 7 Chiapas 2 desconocidos	Mayor contenido de sólidos solubles, acidez titulable y vitamina C. Menor peso, porcentaje de pulpa y firmeza.
2 (7 colectas)	1, 45, 21, 19, 4, 54, 55	1 Tabasco 4 Oaxaca 2 desconocidos	Baja aceptación y valores bajos de peso; porcentaje de pulpa y firmeza mayores.
3 (8 colectas)	16, 51, 20, 53, 58, 50, 31, 62	1 Puebla 1 Oaxaca 3 Veracruz 5 desconocidos	Menor aceptación por parte de los jueces. Valores bajos para peso, porcentaje de pulpa y firmeza.
4 (4 colectas)	22, 48, 32, 63	1 Puebla 2 Oaxaca 1 desconocido	Mayor peso, porcentaje de pulpa y firmeza; mejores puntuaciones para color y forma.

Cuadro 3. Comparación de medias de 11 caracteres evaluados en 40 poblaciones de tomate nativo.
Table 3. Comparison of means of 11 traits evaluated in 40 native tomato populations.

Variable	Grupo				DMSH [†]
	1	2	3	4	
Peso de fruto (g)	11.47 d	58.96 b	28.91 c	121.56 a	10.53
Diámetro de fruto (mm)	26.59 c	46.16 b	39.54 b	56.53 a	8.26
Longitud (mm)	24.06 c	49.57 b	32.25 c	64.51 a	9.85
Porcentaje de pulpa (%)	70.47 b	92.25 a	89.65 a	90.72 a	7.20
Firmeza (N mm ⁻¹)	0.22 b	0.35 ab	0.25 b	0.46 a	0.14
Sólidos solubles (°Brix)	6.59 a	5.56 bc	5.86 ab	4.81 c	0.89
Acidez titulable (% AC)	0.61 a	0.41 b	0.59 a	0.40 b	0.13
Vitamina C (%)	27.0 a	22.0 ab	23.0 a	16.0 b	7.0
Color (escala 1 a 5)	3.47 a	2.67 b	2.65 b	2.95 ab	0.58
Forma (escala 1 a 5)	3.44 a	2.33 b	2.05 b	3.15 a	0.63
Aroma (escala 1 a 5)	2.77 ab	2.59 b	2.55 b	3.03 a	0.37

Promedios con distinta letra en una hilera son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). [†]DMSH= Diferencia mínima significativa honesta. ♦ Averages in a row column with different letters are statistically different (Tukey, $p \leq 0.05$). [†]DMSH= Honest least significant difference.

El Grupo 1 integró 21 poblaciones, alrededor de 50% de las examinadas; 19 de ellas poseen frutos redondos y dos de tipo riñón, que son las de menor tamaño ($p \leq 0.05$) en peso, diámetro y longitud. Asimismo, fueron los de menor porcentaje de pulpa ($p \leq 0.05$). En contraste, como lo detectó el análisis discriminante, los genotipos de este grupo presentaron mayor ($p \leq 0.05$) concentración de sólidos solubles, ácidos orgánicos y vitamina C. Asimismo, tuvieron la mejor aceptación debido a su color, forma y aroma ($p \leq 0.05$).

El Grupo 2 se conformó por siete accesiones, cuatro de ellas con fruto tipo riñón y el resto redondos. El tamaño de fruto fue intermedio, mayor ($p \leq 0.05$) que los de los Grupos 1 y 3. Con excepción de una recolecta, tuvieron baja aceptación sensorial. Su porcentaje de pulpa, firmeza y concentración de vitamina C se ubicó entre los valores mayores ($p \leq 0.05$).

El Grupo 3 integró siete recolectas con fruto tipo riñón y una con forma alargada; el tamaño de fruto fue intermedio con peso, firmeza y porcentaje de pulpa bajos. En contraste, tuvieron contenidos altos de sólidos solubles, ácidos orgánicos y vitamina C ($p \leq 0.05$); al igual que el Grupo 2, tuvieron la menor aceptación por parte de los evaluadores por su color y forma de fruto.

El Grupo 4 captó cuatro accesiones; los frutos presentaron dimensiones mayores ($p \leq 0.05$) en longitud, diámetro y peso, este último hasta de 122 g.

soluble solids, organic acids and vitamin C ($p \leq 0.05$). Like group 2, acceptance by the evaluators was lower because of their color and shape.

Group 4 had four populations. The fruits have larger ($p \leq 0.05$) dimensions in length, diameter and weight of up to 122 g. Moreover, they had higher pulp percentages and firmness, with lower ($p \leq 0.05$) contents of soluble solids, organic acids and vitamin C, but their sensorial acceptance was adequate, similar ($p \leq 0.05$) to that of Group 1

Physical and chemical fruit quality

Among the identified groups, firmness values varied from 0.22 to 0.46 N and Group 4 had the highest value ($p \leq 0.05$). These firmness values are lower than those reported by Batu (2004), who suggests that fruits with firmness above 1.28 N (slightly soft fruits) can be used in salads. Fruits with firmness above 1.46 N are those with the minimum characteristics for commercialization. In this sense, firmness of the native genotypes studied did not show the minimum values necessary for their commercialization. This is due to the presence of irregular epidermal cells, thicker cuticle and greater expression of the enzyme polygalacturonase, traits that have been modified in present-day commercial varieties to obtain suitable standards of quality (Vela-Hinojosa *et al.*, 2018b).

Además, reflejaron los mayores ($p \leq 0.05$) porcentajes de pulpa y firmeza, con el menor ($p \leq 0.05$) contenido de sólidos solubles, ácidos orgánicos y vitamina C; a pesar de ello, su aceptación sensorial fue adecuada, similar ($p \leq 0.05$) a la del Grupo 1.

Calidad físico-química de fruto

Entre los grupos identificados, los valores de firmeza variaron de 0.22 a 0.46 N, y el Grupo 4 presentó el valor más alto ($p \leq 0.05$). Dichos valores de firmeza son inferiores a los reportados por Batu (2004), quien sugirió que frutos con firmeza superior a 1.28 N (frutos ligeramente suaves) pueden utilizarse en ensaladas. Frutos con firmeza mayor de 1.46 N (firmes) reflejan la característica mínima para su comercialización. En este sentido, la firmeza de los genotipos nativos estudiados no mostró los valores mínimos necesarios para su comercialización. Lo anterior se debe a la presencia de células epidérmicas irregulares, cutícula más gruesa y mayor expresión de la enzima poligalacturonasa, caracteres que se modificaron en variedades comerciales actuales para obtener estándares de calidad adecuados (Vela-Hinojosa *et al.*, 2018b).

La concentración media de sólidos solubles de los grupos identificados ocurrió en el intervalo entre 4.81 y 6.6 °Brix. Una asociación de tipo inversa se observó entre el tamaño de fruto y la concentración de sólidos solubles, lo que coincide con la asociación genética negativa entre dichos caracteres, detectada por Goldenberg y von der Pahlen (1966). También se aprecia coincidencia con Binoy *et al.* (2004), quienes afirmaron que es factible encontrar mayores concentraciones de azúcares en los frutos tipo cereza (de tamaño pequeño). Young *et al.* (1993) atribuyen dicho comportamiento a que una amplia gama de genotipos nativos produce frutos con mayor concentración de sólidos solubles debido a su mayor capacidad para acumular fotosintatos.

Los resultados obtenidos coinciden con los observados por Juárez-López *et al.* (2009), quienes reportaron que un híbrido comercial de tomate tipo cereza y un genotipo nativo obtuvieron los mayores valores de 7.2 y 8.0 °Brix, respectivamente. Ello concuerda con los tomates del Grupo 1, en los cuales el resto de sus características físicas los hizo ser similares a los tomates tipo cherry comerciales. Gould (1992) explicó que los sólidos totales tienen implicaciones

The mean concentration of soluble solids of the identified groups occurred in the range of 4.81 to 6.6 °Brix. An inverse association was observed between fruit size and concentration of soluble solids, which coincides with the negative genetic association between said traits, detected by Goldenberg and von der Pahlen (1966). There is also coincidence with Binoy *et al.* (2004), who found higher concentrations of sugars in cherry tomatoes (small size). Young *et al.* (1993) attribute this behavior to the wide spectrum of native genotypes that produce fruits with high concentrations of soluble solids due to their greater capacity to accumulate photosynthates.

The results obtained coincide with those observed by Juárez-López *et al.* (2009), who report that a commercial cherry-type hybrid and a native genotype obtained the highest values, 7.2 and 8.0 °Brix, respectively. This coincides with Group 1 tomatoes, whose other physical characteristics make them similar to commercial cherry tomatoes. Gould (1992) explained that the total solids have direct implications in the tomato processing industry, suggesting that varieties with 5.5 °Brix or higher are desirable for the processing industry. Because of the above, Group 4 tomatoes are not recommended when breeding is focused on fruits for industry.

The mean values of titratable acidity were between 0.40 and 0.61% citric acid (CA). Although these results surpass the range reported by Nuez *et al.* (2001) of 0.3 – 0.4% for commercial tomatoes, Juárez-López *et al.* (2009) found a creole tomato variety with a value 1.01% higher than those found in our study. The intervals of acidity observed are similar to those documented in the research of Binoy *et al.* (2004) and Raffo *et al.* (2002) for commercial hybrids and cherry tomatoes, respectively. It is important to underline that Groups 1 and 3, which include smaller fruit, reflected the highest values of acidity because the polymeric carbohydrates (starch, peptic substances and hemicellulose) are more concentrated in small fruits than in larger fruits in which they are diluted in the fruit water.

Group 1 accessions had the highest contents of vitamin C (27%), contrasting with Group 4 that had 16%. The values observed are higher than those reported by the USDA (2015), 13.7%; Sulbarán *et al.* (2011), 19.2 %; and Crisanto-Juárez *et al.* (2010), 6.1 to 16.1 %. The interval of ascorbic acid content in native tomato collections obtained by Juárez-

directas en la industria del procesamiento de tomate, lo cual sugiere que las variedades con un contenido de 5.5 °Brix o mayor son deseables para la industria de procesamiento. Por lo antes expuesto, los tomates del Grupo 4 no se recomiendan para el mejoramiento enfocado a frutos para la industria.

Los valores medios de acidez titulable ocurrieron entre 0.40 y 0.61% de ácido cítrico (AC). Aunque dichos resultados rebasan el intervalo reportado por Nuez *et al.* (2001) de 0.3 – 0.4% de AC para tomates comerciales, Juárez-López *et al.* (2009) encontraron una variedad de tomate criollo con un valor de 1.01%, superior a los encontrados en esta investigación. De manera general, los intervalos de acidez observados son similares a los documentados en otras investigaciones, entre las que destacan las de Binoy *et al.* (2004) y de Raffo *et al.* (2002) para híbridos comerciales y tomates cherry, respectivamente. Es importante destacar que los Grupos 1 y 3, que contienen a los frutos de menor tamaño, son los que reflejaron los valores mayores de acidez, toda vez que los carbohidratos poliméricos (almidón, sustancias pépticas y hemicelulosa) se encuentran más concentrados en los frutos pequeños que en los de mayor tamaño, en los que se diluyen con el agua en el fruto.

Las accesiones del Grupo 1 mostraron el valor mayor de contenido de vitamina C (27%), en contraste con el Grupo 4, el cual mostró 16%. Los valores observados son mayores que los reportados por el USDA (2015) de 13.7%, Sulbarán *et al.* (2011), de 19.2% y Crisanto-Juárez *et al.* (2010), de 6.1 a 16.1%. No obstante, el intervalo de contenido de ácido ascórbico en recolectas de tomate nativo obtenido por Juárez-López (2009), fue de 37.0 hasta 65.6%. Por la amplia gama de reportes en la literatura, Crisanto-Juárez *et al.* (2010) mencionaron que hay recolectas promisorias por su contenido de vitamina C, por lo cual es conveniente documentar con mayor precisión la variación genética del tomate, a fin de promover la conservación y el aprovechamiento de dichos materiales.

Calidad hedónica de fruto

De las características hedónicas estudiadas, sólo tres reflejaron diferencias estadísticas entre grupos a través de análisis de varianza.

El color fue el primer factor de calidad juzgado por los consumidores. Las evaluaciones de color: L,

López (2009) was 37.0 and up to 65.6%. Because of the wide spectrum of reports in the literature, Crisanto-Juárez *et al.* (2010) mentioned that there are promising collections because of their vitamin C content, and therefore, it would be advantageous to document more precisely the genetic variation in tomatoes, to promote the conservation and use of these materials.

Fruit hedonic quality

Of the sensorial characteristics studied, the analysis of variance revealed only three that were statistically different among the groups. Color was the first quality factor judged by the consumers. Assessment of color, L, chroma and hue angle did not find differences among groups, although subjective evaluation of fruit color did show differences ($p \leq 0.05$); that is, Group 1 fruits were preferred for this property.

Tomato fruits have several sizes and shapes, from small and round to large kidney-shaped fruits. A morphological characteristic that distinguishes cultivated tomato varieties from non-domesticated varieties is fruit shape (Talbot *et al.*, 2007), which is coherent with the shapes found in this study: round (Groups 1 and 4) and kidney-shaped (Groups 2 and 3). The most accepted shape was that of Group 1, round and small, similar to cherry tomatoes, followed by preference for the shape of Group 4 fruits, which is also round, but larger, similar to commercial round tomatoes. In contrast, Groups 2 and 3, kidney-shaped, were visually less accepted. In this sense, the evaluators related fruit shape with the shapes of commercial varieties, and thus we infer that they felt attracted by more familiar standards.

All fruits and vegetables produce a set of low molecular weight compounds that have certain volatility in ambient temperature. These compounds may not be quantitatively important, but they define the aroma of fruits and vegetables (Kader, 2008). Perception of tomato aroma depends on the composition and concentration of volatile compounds that stimulate olfactory neurons located on the roof of the nasal cavity (Dávila-Aviña *et al.*, 2011). In the case of the tomatoes studied, Group 4 had more acceptance, coinciding with Camarena-Barrera *et al.* (2010), who reported that larger fruits have more volatile compounds than grape, or smaller,

croma y ángulo Hue, no permitieron identificar diferencias entre grupos; sin embargo, la evaluación subjetiva de la percepción del color de fruto mostró diferencias ($p \leq 0.05$); es decir, los frutos del Grupo 1 fueron los más preferidos por dicha propiedad.

El fruto de tomate es de diversos tamaños y formas, desde pequeños y redondos hasta grandes y de forma arriñonada. Una característica morfológica para distinguir a las variedades cultivadas de tomates no domesticados es la forma del fruto (Talbot *et al.*, 2007), lo cual fue coherente con las formas encontradas en la presente investigación: redondeados (Grupos 1 y 4) y arriñonados (Grupos 2 y 3). La forma de mayor aceptación fue la del Grupo 1, redonda y pequeña, similar a los tomates cereza, seguida por la afinidad de la forma de los frutos del Grupo 4, que también fue redonda, aunque de mayor tamaño, similar a los tomates tipo bola comerciales. En contraste, los Grupos 2 y 3 de forma arriñonada fueron visualmente menos aceptados. En este sentido, los evaluadores relacionaron las formas de los frutos con las utilizadas en el comercio, por lo cual se infiere que se sintieron atraídos por los estándares que les resultaron más familiares.

Todas las frutas y hortalizas producen un conjunto de compuestos de bajo peso molecular que poseen cierta volatilidad a temperatura ambiente. Dichos compuestos pueden no tener importancia cuantitativa, pero definen el aroma de frutas y hortalizas (Kader, 2008). La percepción del aroma del tomate depende de la composición y concentración de los compuestos volátiles que estimulan a las neuronas olfativas ubicadas en el techo de la cavidad nasal (Dávila-Aviña *et al.*, 2011). En el caso de los grupos de tomates estudiados, los del Grupo 4 fueron los de mayor aceptación, lo cual concuerda con la investigación realizada por Camarena-Barrera *et al.* (2010). Según dichos autores, los frutos de mayor tamaño presentaron mayor cantidad de compuestos volátiles que los tomates uva o de tamaños menores, por cual el aroma percibido por las personas fue mayor o con mayor intensidad en frutos más grandes. Una posible explicación obedece a que la calidad organoléptica de los materiales nativos al tener una asociación fuerte con los procesos de domesticación resultó en la selección de materiales de tamaño de fruto mayor, asociado con aromas agradables, lo cual garantizaría su consumo en fresco, debido a que la cultura y gastronomía de una comunidad permiten la conservación de características deseables.

tomatoes. For this reason, the aroma perceived by the evaluators was stronger or more intense in larger fruits. One possible explanation is that the organoleptic quality of the native materials, which is strongly associated with processes of domestication, resulted in the selection of larger fruits with pleasant aromas. This would guarantee its fresh consumption because the culture and gastronomy of a community lead to conservation of desirable characteristics.

Conservation strategy

The processes of breeding tomatoes require allelic variants (Varshney *et al.*, 2009). This obeys the premise that conservation of populations should guarantee maintenance of the broadest possible genetic variation (Zamir, 2001) and, simultaneously, preserve those individuals with the most suitable expression of the traits of interest. In our research, the postharvest quality traits possessed by population Groups 1 and 4 grouped the best candidates for their preservation because they had the highest values for the traits of interest and, thus, they would have potential use in genetic improvement of this vegetable. Therefore, 25 populations that represent 62.5% of the evaluated germplasm would be selected, a percentage similar to that proposed by Marín-Montes *et al.* (2016), suggesting that the proportion to be preserved is adequate and efficient. Despite this, it is recommended that the accessions that were not selected for conservation be evaluated by other approaches to identify their potential use in tomato breeding.

CONCLUSIONS

Native populations suitable for fresh consumption and for industrial processing were identified. However, the lack of firmness and short shelf life do not permit their commercialization. Of 22 traits, 12 were useful in identifying groups of populations with similar characteristics. Fruit weight and shape were those of highest discriminatory value.

Conservation of 25 genotypes (Groups 1 and 4) is necessary because they can be used as sources of useful genetic variation for genetic improvement of intrinsic chemical characteristics of the fruit (concentration of soluble solids, titratable acidity and vitamin C). Group 1 has potential to be cultivated as cherry tomatoes, exhibiting suitable size and pleasant

Estrategia de conservación

Los procesos de mejoramiento del tomate requieren de variantes alélicas (Varshney *et al.*, 2009). Lo anterior obedece a la premisa de que la conservación de las poblaciones debe garantizar el mantenimiento de la mayor variación genética posible (Zamir, 2001) y, de forma simultánea, preservar aquellos individuos con la expresión más adecuada de los caracteres de interés. En la presente investigación, los caracteres de calidad poscosecha de las poblaciones que conformaron los Grupos 1 y 4, agruparon a los mejores candidatos para su resguardo, en virtud de que presentaron los valores mejores para los caracteres de interés, por lo que se tendrían un uso potencial para el mejoramiento genético de esta hortaliza. Por lo antes expuesto, se elegirían 25 poblaciones, que representan 62.5% del germoplasma evaluado, porcentaje similar al propuesto por Marín-Montes *et al.*, (2016), lo cual sugiere que la proporción a resguardar podría ser adecuada y eficiente. A pesar de ello, se sugiere que las accesiones no seleccionadas para su resguardo se evalúen mediante otros enfoques, con el fin de identificar su uso potencial en el mejoramiento genético del tomate.

CONCLUSIONES

Poblaciones nativas de tomate aptas para su consumo fresco y procesamiento industrial se identificaron, pero la falta de firmeza del fruto y vida de anaquel no permitiría su comercialización. Doce de 22 caracteres fueron útiles para identificar grupos de poblaciones con características similares. El peso y la forma de fruto fueron las de mayor valor discriminativo.

La conservación de 25 genotipos (Grupos 1 y 4) es necesaria porque se podrían emplear como fuentes de variación genética útil para el mejoramiento genético de características químicas intrínsecas del fruto (concentración de sólidos solubles, acidez titulable y vitamina C). El Grupo 1 posee potencial para cultivarse como tomates tipo “cherry”, porque mostró tamaños adecuados y sabores agradables en la evaluación hedónica, mientras que las recolectas del Grupo 4 pueden emplearse como fuentes de contribución para mejorar la firmeza, aunque sus valores distan aún de los requeridos en el mercado. A pesar de ello, este grupo no se recomienda en el mejoramiento de variedades para el procesamiento industrial.

taste in the hedonic evaluation, while the collections of Group 4 can be used as sources to improve firmness, although their values are still far from those required by the market. This group, however, is not recommended for improving varieties destined for industrial processing.

—End of the English version—

---*---

LITERATURA CITADA

- Álvarez-Hernández, J. C., H. Cortez-Madrugal, e I. García-Ruiz. 2009. Exploración y caracterización de poblaciones silvestres de jitomate (*Solanaceae*) en tres regiones de Michoacán, México. *Polibotánica* 28: 139 - 159.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official Methods of Analysis. Ed. Benjamin Franklin Station. USA. 1018 p.
- Bao, B., L. Ke, J. Jiang, and T. Ying. 2007. Fruit quality of transgenic tomatoes with suppressed expression of LeETR1 and LeETR2 genes. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 16: 122 - 126.
- Bastias, M. E. 2008. Biodiversidad y recursos filogenéticos en la agricultura. *IDESIA*. 26: 5 - 7.
- Batu, A. 2004. Determination of acceptable firmness and color values of tomatoes. *J. Food Eng.* 61: 471 - 475.
- Bernacchi, D., T. Beck-Bunn, D. Emmatty, Y. Eshed, S. Inai, J. López, V. Petiard, H. Sayama, J. Uhlig, D. Zahir, and S. Tankesley. 1998. Advanced backcross QTL analysis of tomato. II. Evaluation of near-isogenic lines carrying single-donor introgressions for desirable wild QTL-alleles derived from *Lycopersicon hirsutum* and *L. pimpinellifolium*. *Theor. Appl. Genet.* 97: 170 - 180.
- Berrospe-Ochoa, E. A., C. Saucedo-Veloz; M. E. Ramírez-Guzmán, D. Saucedo-Reyes. 2018. Flavor components and ascorbic acid content in native and commercial hybrid tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). *Agrociencia*. 52: 623-638.
- Bertin, N., M. Causse, B. Brunel, D. Tricon, and M. Génard. 2009. Identification of growth processes involved in QTLs for tomato fruit size and composition. *J. Exp. Bot.* 60: 237 - 248.
- Binoy, G., C. Kaur, D. S. Khurdiya, and H. C. Kapoor. 2004. Antioxidants in tomato as a function of genotypes. *Food Chem.* 84: 45 - 51.
- Bonilla-Barrientos, O., R. Lobato-Ortiz, J. García-Zavala, S. Cruz-Izquierdo, D. Reyes-López, E. Hernández-Leal, y A. Hernández-Baustista. 2014. Diversidad agronómica y morfológica de tomates arriñonados y tipo pimiento de uso local en Puebla y Oaxaca, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 37: 129 - 139.
- Cadahía L., C., M. L. Segura L. y A. M. Massaguer R. 2005. Apéndice 1: Fertirrigación de cultivo hortícola. *In: Cadahía L., C. (ed). Fertirrigación: Cultivos Hortícolas, Frutales y Ornamentales*. 3ª. edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. pp: 355-428.

- Camarena-Barrera, E. A., K. Ramos-Beltrán, R. Miranda-López, S. N. Jiménez García, y R. G. Guevara-González. 2010. Perfil del aroma del tomate (*Lycopersicon esculentum*) variedades saladette y uva por análisis sensorial y GC-MS. *RESPYN*. 9: 1471 - 1479.
- Carrillo-Rodríguez, J. C., y J. L. Chávez-Servia. 2010. Caracterización agromorfológica de muestras de tomate de Oaxaca. *Rev. Fitotec. Mex.* 33: 1 - 6.
- Cervantes-Moreno, R., J.E. Rodríguez-Pérez, C. Carrillo-Fonseca, J. Sahagún-Castellanos, y E. Rodríguez-Guzmán. 2014. Tolerancia de 26 colectas de tomates nativos de México al nemátodo *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 20: 5 - 18.
- Crisanto-Juárez, A., A. M. Vera-Guzmán, J. L. Chávez-Servia, y J. C. Carrillo-Rodríguez. 2010. Calidad de frutos de tomates silvestres (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* Dunal) de Oaxaca, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 33: 7 - 13.
- Chaib, J., M. F. Devaux, M. G. Grotte, K. Robini, M. Causse, M. Lahaye, and I. Marty. 2007. Physiological relationships among physical, sensory and morphological attributes of texture in tomato fruits. *J. Exp. Bot.* 58: 1915 - 1925.
- Chávez-Servia, J. L., A. M. Vera-Guzmán, J. C. Carrillo-Rodríguez, I. A. Pachecho-Triste, y A. U. Crisanto-Juárez. 2011. Variación morfológica y de licopeno en frutos de tomate semidomesticado y cultivado en Oaxaca, México. *J. Int. Am. Soc. Trop. Agric. Hortic.* 54: 151 - 153.
- Dávila-Aviña, J. E. De J., G. A. González-Aguilar, J. F. Ayala-Zavala, D. R. Sepúlveda, y G. I. Olivas. 2011. Compuestos volátiles responsables del sabor del tomate. *Rev. Fitotec. Mex.* 34: 133 - 143.
- Figuroa-Cares, I. E., O. Cruz-Álvarez, J. E. Rodríguez-Pérez, M. T. Martínez-Damián, S. Valle-Guadarrama. 2018. Calidad nutricional y capacidad antioxidante en variedades y genotipos nativos de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 35: 63-84.
- Goldenberg, J. B., and A. von der Pahlen. 1966. Genetic and phenotypic correlation between weight and dry matter content of tomato fruits and their heritabilities. *Bol. Genét. Argentina* 2: 1 - 15.
- Gould, W. A. 1992. *Tomato Production, Processing and Technology*. CTI publications. USA. 550 p.
- Hotelling, H. 1951. A generalized t test and measure of multivariate dispersion. *Proceedings of the Second Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability*. Berkeley, California: University of California Press. pp: 23 - 41.
- Hunt, R. W. G., and M. R. Pointer. 2011. *Measuring Color*. 4a Ed. Wiley-IS&T. Series in Imaging Science and Technology. John Wiley & Sons, Ltd., Publication. USA. ISBN 978-1-119-97537-3. 469 p.
- Ibarbia, E. A., and V. N. Lambeth. 1971. Tomato fruit size and quality interrelationships *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 96: 199 - 201.
- Johnson, D. E. 1998. *Applied Multivariate, Methods for Data Analysts*. Cole Publishing Company. USA. 566 p.
- Juárez-López, P., R. Castro-Brindis, T. Colinas-León, P. Ramírez-Vallejo, M. Sandoval-Villa, D. W. Reed, L. Cisneros-Zevallos, y S. King. 2009. Evaluación de calidad de frutos de siete genotipos nativos de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*). *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 15: 5 - 9.
- Kader, A. A. 2008. Flavor quality of fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 88: 1863 - 1868.
- Ladizinsky, G. 1998. *Plant Evolution under Domestication*. Kluwer Academic. Dordrecht (Ed.). The Netherlands. 262 p.
- Lobato O., R., E. Rodríguez G., J. C. Carrillo R., J. L. Chávez S., P. Sánchez P, y A. Aguilar M. 2012. Exploración, colecta y conservación de recursos genéticos de jitomate: avances en la Red de Jitomate. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y Colegio de Postgraduados. Texcoco, México. 54 p.
- Marín-Montes, I. M., R. Lobato-Ortiz, G. Carrillo-Castañeda, J. E. Rodríguez-Pérez, J. J. García-Zavala, Á. M. Velasco-García. 2019. Allelic richness of native tomato populations (*Solanum lycopersicum* L.) for plant breeding. *Agrociencia* 53: 355-370.
- Marín-Montes, I. M.; J. E. Rodríguez-Pérez, J. Sahagún-Castellanos, L. Hernández-Ibáñez, y A. M. Velasco-García. 2016. Morphological and molecular variation in 55 native tomato collections from Mexico. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 22: 117 - 131.
- Molina M., J. C., y L. Cordova T. 2006. Recursos Fitogenéticos de México para la Alimentación y la Agricultura: Informe Nacional 2006. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México. 172 p.
- Nuez, F., A. Rodríguez, J. Tello, J. Cuartelos, y B. Segura. 2001. *El Cultivo del Tomate*. Mundi-Prensa. España. 793 p.
- Núñez-Colín, C. A., y D. Escobedo-López. 2011. Uso correcto de análisis clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. *Agron. Mesoam.* 22: 415 - 427.
- Pacheco-Triste, I. A., J. L. Chávez-Servia, y J. C. Carrillo-Rodríguez. 2014. Relación entre variación ecológica- orográfica y variabilidad morfológica de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Oaxaca. *Rev. Mex. Agroecosistemas* 1: 28 - 39.
- Peralta, I. E., and D. M. Spooner. 2007. History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*). In: Razdan M. K. and A. K. Matto (eds). *Genetic Improvement of Solanaceous Crop Vol. 2*. Science Publishers. Enfield, USA pp: 1 - 27
- Raffo, A., C. Leonardi, V. Flogiano, P. Ambrosino, M. Salucci, L. Gennaro, R. Bugianesi, F. Giuffrida, and G. Quaglia. 2002. Nutritional value of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1) harvested at different ripening stages. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6550 - 6556.
- Rick, C. M. 1986. Germoplasm resources in the wild tomato species. *Acta Hortic.* 190: 39 - 47.
- Ríos-Osorio, O., J. L. Chávez-Servia, J. C. Carrillo-Rodríguez, y A. M. Vera-Guzmán. 2014a. Variación agromorfológica y cambios biofísicos poscosecha en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Rev. Fac. Cienc. Agrar.* 46: 29 - 44.
- Ríos-Osorio, O., J. L. Chávez-Servia, y J. C. Carrillo-Rodríguez. 2014b. Producción tradicional y diversidad de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) nativo: un estudio de caso en Tehuantepec-Juchitán, México. *ASyD* 11: 35 - 51.
- Salgado-Meraz, L., R. Lobato-Ortiz, L. J. Pérez-Flores, S. Cruz-Izquierdo, C. Peña-Valdivia, y J. J. García-Zavala. 2018. Diversidad agronómica de poblaciones de jitomate tipo "cherry" *S. lycopersicum* L. y *S. pimpinellifolium* L. con potencial en el mejoramiento genético. *Rev. Fitotec. Mex.* 41: 499-507.
- SAS Institute. 1983. Cubic clustering criterion. SAS technical report A108. Cary, N.C. USA. 50 p.

- Sulbarán, B., E. Sierra, G. Ojeda De Rodríguez, M. Berradre, V. Fernández y J. Peña. 2011. Evaluación de la actividad antioxidante del tomate crudo y procesado. *Rev. Fac. Agron. Luz* 28: 273 - 291.
- Talbot, B. M., J. B. Moyseenko, and A. J. Monforte. 2007. Morphological variation in tomato: a comprehensive study of quantitative trait loci controlling fruit shape and development. *J. Exp. Bot.* 58: 1339 - 1349.
- Tochihuitl M., G. A., C. Saucedo V., G. Arellano O., C. García O., J. Suárez E. 2017. Evaluación de la calidad de frutos de jitomate de cuatro poblaciones nativas y un híbrido comercial. *Rev. Iberoam. Tec. Postcosecha* 18: 47 - 52.
- Touré A., S., R. Nieto A., J. E. Rodríguez P., A. F. Barrientos P., L. A. Ibáñez C., E. Romanchik K. y C. A. Núñez C. 2010. Variación anatómica del xilema del tallo de cultivares de jitomate injertados en un tipo criollo. *Rev. Chapingo Ser. Hort.* 16: 67 - 76.
- Urrieta-Velázquez, J. A., M. Rodríguez-Mendoza, P. Ramírez-Vallejo, G. A. Baca-Castillo, L. Ruiz-Posada, y J. A. Cueto-Wong. 2012. Variables de producción y calidad de tres selecciones de tomate de costilla (*Solanum lycopersicum* L.). *Rev. Chapingo Ser. Hort.* 18: 371 - 381.
- USDA (United States Department of Agriculture). 1975. Tomato Color Chart. USDA Visual Aid TM-L-1. <https://ucanr.edu/repository/view.cfm?article=83755%20&groupid=9>
- USDA (United States Department of Agriculture). 2015. National Nutrient Database for Standard Reference Legacy Release, Basic report 11529, tomatoes, red, ripe, raw, year round average. USA. 2 p. <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/11529>
- Vásquez-Ortiz, R., J. C. Carrillo-Rodríguez, y P. Ramírez-Vallejo. 2010. Evaluación morfo-agronómica de una muestra del tomate nativo del centro y sureste de México. *Naturaleza y Desarrollo* 8: 49 - 64.
- Varshney, R. K., D. A., Hoisington, S. N., Nayak, and A. Graner. 2009. Molecular plant breeding: methodology and achievements. *In: Somers, D. J., P. Langridge, and J. P. Gustaf (eds). Plant Genomics. Humana press. New York. pp: 283 - 304.*
- Vela-Hinojosa, C., C. Barbosa-Martínez, H. B. Escalona-Buendía, J. A., Mendoza-Espinoza, R. Lobato-Ortiz, J. E., Rodríguez-Pérez, J. M., Villa-Hernández, and L. J. Pérez-Flores. 2018a. Architectural diversity of the cuticle and epidermis of native and hybrid tomato fruit genotypes and the relation to polygalacturonase expression. *Not. Bot. Horti. Agrobot. Cluj. Napoca.* 46: 45 - 51.
- Vela-Hinojosa, C., H. B. Escalona-Buendía, J. A. Mendoza-Espinoza, F. Díaz de León-Sánchez, R. Lobato-Ortiz, J. E. Rodríguez-Pérez, M. Ramírez-Aguilar, F. Pérez-Díaz, J. M. Villa-Hernández, and L. Pérez-Flores. 2018. Chemical and sensory analysis of native genotypes and experimental lines of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Fruits* 73: 60-71.
- Velasco-Alvarado, M. de J., R. Lobato-Ortiz, J. J. García-Zavala, R. Castro-Brindis, S. Cruz-Izquierdo, T. Corona-Torres, and M. K. Moedano-Mariano. 2017. Mexican native tomatoes as rootstocks to increase fruit yield. *Chilean JAR* 77: 187 - 193.
- Young, T. E., J. A. Jovic, and G. Sullivan. 1993. Accumulation of the components of total solids in ripening fruits of tomato. *Amer. J. Hort. Sci.* 118: 286 - 292.
- Zamir, D. 2001. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature Reviews Genetics* 2: 983 - 989.

ESTADO NUTRIMENTAL E INFESTACIÓN EN *Pseudotsuga menziesii* POR EL TIZÓN SUIZO (*Phaeocryptopus gaeumannii*) EN AQUIXTLA, PUEBLA

NUTRITIONAL STATUS AND INFESTATION IN *Pseudotsuga menziesii* BY SWISS NEEDLE CAST (*Phaeocryptopus gaeumannii*) AT AQUIXTLA, PUEBLA

Iván Fermín Quiroz-Ibáñez¹, Víctor Manuel Cetina-Alcalá^{1*}, Miguel Ángel López-López¹,
Silvia Edith García-Díaz², J. Jesús Vargas-Hernández¹

¹Ciencias Forestales. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (vicmac@colpos.mx). ²División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Texcoco, Estado de México.

RESUMEN

Las plantaciones de árboles de navidad con la especie *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco ocupan 10% de la superficie total de este tipo de plantaciones en México. El tizón suizo es una enfermedad propia de del género *Pseudotsuga*, originada por el hongo *Phaeocryptopus gaeumannii* (T. Rohde) Petrak (1938). Los principales síntomas incluyen follaje clorótico y abscisión prematura de acículas infectadas, lo que resulta en copas ralas. El objetivo de este estudio fue determinar la relación entre la fertilización química y el estado nutricional de los árboles con los niveles de severidad e incidencia de la enfermedad. La hipótesis fue que hay una correlación entre el estado nutricional y la variación del grado de infestación del tizón suizo en *P. menziesii*. El estudio se estableció en el predio multifuncional “El Manantial” en Aquixtla, Puebla. Los tratamientos fueron fertilización con urea y sulfato de potasio y control fitosanitario químico con propiconazol y prochloraz. El diseño experimental fue bloques al azar generalizado, evaluando dos factores controlados con tres niveles (factorial 3²) y como factor de confusión o bloqueo el nivel visual de transparencia de copa asociado al tizón suizo. La incidencia y la severidad se evaluaron. Los resultados del ANDEVA no indicaron diferencias significativas. De las variables nutricionales las de mayor asociación a la severidad e incidencia fueron el contenido de Ca y Mn, y en menor medida, Cu, Mg y N. Entre los tratamientos se observaron antagonismos y sinergismos con efecto en el estado nutricional. Los fungicidas influyen en la absorción, transporte y asimilación de los nutrimentos.

Palabras clave: abeto Douglas, *Pseudotsuga menziesii*, árboles de navidad, *Phaeocryptopus gaeumannii*, nutrición.

ABSTRACT

Pseudotsuga menziesii (Mirb.) Franco covers 10% of the total area of Christmas tree commercial plantations in Mexico. Swiss needle cast (SNC) is a disease particular to the genus *Pseudotsuga*, caused by the fungus *Phaeocryptopus gaeumannii* (T. Rohde) Petrak (1938). The main symptoms include chlorotic foliage and premature abscission of infected needles, resulting in thin crowns. The objective of this study was to determine the relationship of chemical fertilizer and tree nutritional status to severity and incidence levels of the disease. The hypothesis was that nutritional status correlates with variations on SNC infestation level in *P. menziesii*. The study was set up in the multipurpose forested land “El Manantial” in Aquixtla, Puebla. Treatments were fertilization with urea and potassium sulphate, and a chemical phytosanitary control with propiconazole and prochloraz. The experimental design was generalized random blocks, evaluating two controlled factors with three levels (factorial 3²) and, as the confounding or blocking factor, the visual level of crown transparency associated with SNC. Incidence and severity were evaluated. The results of the ANOVA did not indicate significant differences. Of the nutrient variables, those that had higher association with severity and incidence were Ca and Mn contents, and to a lesser degree, Cu, Mg and N. Among the treatments, antagonisms and synergisms were observed to affect nutrient status. Fungicides affected nutrient absorption, transport, and assimilation.

Key words: Douglas fir, *Pseudotsuga menziesii*, Christmas trees, *Phaeocryptopus gaeumannii*, nutrition.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: julio, 2019. Aprobado: mayo, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 797-811. 2020.

INTRODUCCIÓN

El abeto Douglas (*Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco) es parte de la vegetación de México y su distribución geográfica natural es de Sonora a Oaxaca (Domínguez, 2015). A partir del siglo XVII, en Alemania, se utiliza esta especie como árbol de navidad. La tradición se extendió a Inglaterra y luego a EUA, donde ahora se comercializan varias especies de *Abies* Mill., *Pinus* L., *Picea* Link y *P. menziesii* (Hansen y Lewis, 2003). Las especies típicas cultivadas en México como árboles de navidad son *Pinus ayacahuite* Ehrenb. ex Schltld., *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus cembroides* Zucc., *Pinus greggii* Engelm. ex Parl., *Abies religiosa* Schltld. & Cham., *Picea* sp., *Cupressus lusitanica* Mill., *Chamaecyparis* sp. Spach y *Thuja* sp. L. (CONAFOR, 2017). El género *Pseudotsuga* ocupó el 10% de la superficie establecida con plantaciones de árboles de navidad entre 2013 y 2017 en México (CONAFOR, 2017).

El tizón suizo es una enfermedad propia del género *Pseudotsuga*, la cual se origina por el hongo *Phaeocryptopus gaeumannii* (T. Rohde) Petr. (1938) = *Nothophaeocryptopus gaeumannii* (Videira *et al.*, 2017). Este hongo parasita las acículas, produce un micelio intracelular y en los estomas presenta pseudotecios (Hansen *et al.*, 2000; Stone *et al.*, 2008). Manter *et al.* (2000) descubrieron que el intercambio gaseoso en las acículas infectadas por *P. gaeumannii* es afectado cuando emergen los pseudotecios de los estomas, y propicia que la asimilación de CO₂ disminuya. Los principales síntomas incluyen follaje clorótico y abscisión prematura de acículas infectadas que dan como resultado copas ralas (Hansen *et al.*, 2000). Las acículas de *P. menziesii* tienen un período de vida de siete años, pero con la enfermedad pueden permanecer menos de cinco años, y en daños más severos sólo pueden mantener follaje del último período vegetativo (Hansen y Lewis, 2003); además, reduce el crecimiento de los árboles infectados (Hansen *et al.*, 2000; Cibrián *et al.* 2014; Lan *et al.*, 2019). Este patógeno se reportó primero en Suiza (1925), después se supo que el hongo es nativo de Norteamérica y se introdujo por accidente en Europa (Hansen *et al.*, 2000; Stone *et al.*, 2008). En EUA y Canadá afecta grandes regiones del noroeste y merma el crecimiento de *P. menziesii* (Cibrián *et al.*, 2014). Este patógeno se expandió a varias regiones donde *Pseudotsuga* es una especie introducida, principalmente en países del

INTRODUCTION

Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco) is part of the vegetation of Mexico. Its natural geographic distribution extends from Sonora to Oaxaca (Domínguez, 2015). Since the 17th century in Germany, this species has been used for Christmas trees. The tradition spread to England and later to the United States, where several species are now commercialized: *Abies* Mill., *Pinus* L., *Picea* Link and *P. menziesii* (Hansen and Lewis, 2003). The species typically cultivated in Mexico for Christmas trees are *Pinus ayacahuite* Ehrenb. ex Schltld., *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus cembroides* Zucc., *Pinus greggii* Engelm. ex Parl., *Abies religiosa* Schltld. & Cham., *Picea* sp., *Cupressus lusitanica* Mill., *Chamaecyparis* sp. Spach and *Thuja* sp. L. (CONAFOR, 2017). The genus *Pseudotsuga* occupied 10% of the area established with Christmas tree plantations between 2013 and 2017 in Mexico (CONAFOR, 2017).

Swiss needle cast (SNC), a disease that is specific to the genus *Pseudotsuga*, is caused by the fungus *Phaeocryptopus gaeumannii* (T. Rohde) Petr. (1938) = *Nothophaeocryptopus gaeumannii* (Videira *et al.*, 2017). This fungal pathogen parasites the needles and produces intracellular mycelium, and pseudothecium is present in the stomata (Hansen *et al.*, 2000; Stone *et al.*, 2008). Manter *et al.* (2000) discovered that gas exchange in needles infected by *P. gaeumannii* is affected when the pseudothecium emerges from the stomata and reduce CO₂ assimilation. Main symptoms include chlorotic foliage and premature abscission of infected needles, resulting in thin crowns (Hansen *et al.*, 2000). *P. menziesii* needles have a life of seven years, but with the disease, they can last less than five years. With more severe damage, they maintain the foliage of only the last vegetative period (Hansen and Lewis, 2003). Furthermore, the fungus reduces tree growth (Hansen *et al.*, 2000; Cibrián *et al.* 2014; Lan *et al.*, 2019). This pathogen was first reported in Switzerland (1925). Later, it was found to be native to North America and was introduced accidentally into Europe (Hansen *et al.*, 2000; Stone *et al.*, 2008). In the United States and Canada, it affects large regions of the northwest and shrinks the growth of *P. menziesii* (Cibrián *et al.*, 2014). The fungus spread to several regions where *Pseudotsuga* is an introduced species, mainly in countries of the southern hemisphere, Europe, the Middle East and Oceania. Thus, SNC is a phytosanitary problem

hemisferio sur, Europa, Asia occidental y Oceanía, por lo que es un problema fitosanitario en el cultivo de árboles de navidad y bosques naturales (Hansen *et al.*, 2000; Morales *et al.*, 2012).

En México hay cepas locales de *P. gaeumannii*, colonizadoras de *P. menziesii* var. *glauca*, en la Sierra Madre Occidental, la Sierra Madre Oriental y en la Sierra Madre del Sur, así como en diversas plantaciones de árboles de navidad en 11 estados del centro del país (Cibrián *et al.*, 2014).

La fertilización tiene efectos en el crecimiento y productividad, ya que al mejorar el estado nutricional de los árboles, adquieren mayor resistencia o tolerancia a plagas (Binkley y Fisher, 2013). Aunque la resistencia y la tolerancia están controladas genéticamente, son influenciadas por factores ambientales; la nutrición puede considerarse como un factor ambiental que puede manipularse con relativa facilidad mediante la aplicación de fertilizantes, para mitigar el estrés biótico (Huber *et al.*, 2012). Todos los nutrientes esenciales reportados influyen en la incidencia y severidad de algunas enfermedades, pero ningún nutriente individual puede controlar todas las enfermedades o favorecer el control de enfermedades para algún grupo de plantas (Huber y Graham, 1999).

Según el estado nutricional de la planta, el nutriente, las especies de plantas y el tipo de patógeno o plaga, la nutrición puede afectar la resistencia/tolerancia de la planta, o la virulencia del patógeno (Huber *et al.*, 2012). Los efectos de N, P y K en la incidencia y severidad de enfermedades se reportan con más frecuencia que los efectos de micronutrientes (Huber y Graham, 1999). El exceso de N aumenta la severidad de la infección por tizón suizo (El-Hajj *et al.*, 2004) y su balance con el P la mantiene, aunque en general el efecto de la fertilización en la enfermedad es parcialmente entendido (Mulvey *et al.*, 2013). El objetivo de este estudio fue identificar al tizón suizo mediante su morfología, y evaluar el efecto de la fertilización química y el estado nutricional de los árboles, a partir de los niveles de severidad e incidencia (*i.e.* grado de infestación o intensidad), en una plantación de *P. menziesii* de siete años. La hipótesis es que hay una correlación entre el estado nutricional y la variación del grado de infestación del tizón suizo en *P. menziesii*.

for Christmas tree production as well as for natural forests (Hansen *et al.*, 2000; Morales *et al.*, 2012).

In Mexico, there are local strains of *P. gaeumannii*, colonizers of *P. menziesii* var. *glauca*, in the Sierra Madre Oriental and in the Sierra Madre del Sur, as well as in several Christmas tree plantations in 11 states of central Mexico (Cibrián *et al.*, 2014).

Fertilization affects growth and productivity since it improves nutrient status of the trees, so that they acquire greater resistance or tolerance to pests (Binkley and Fisher, 2013). Although resistance and tolerance are controlled genetically, they are influenced by environmental factors. Nutrition can be considered an environmental factor that can be manipulated with relative ease through application of fertilizers to mitigate biotic stress (Huber *et al.*, 2012). All the essential nutrients reported have an influence in incidence and severity of some diseases, but no individual nutrient can control all the diseases or favor the control of disease over a given group of plants (Huber and Graham, 1999).

Depending on the nutritional status of the plant, the nutrient, the plant species and the type of pathogen or pest, nutrition can affect resistance/tolerance of the plant or the virulence of the pathogen (Huber *et al.*, 2012). The effects of N, P, and K on incidence and severity of some diseases is reported more often than the effects of micronutrients (Huber and Graham, 1999). Excessive N increases the severity of SNC infection (El-Hajj *et al.*, 2004), and its balance with P maintains the disease. Though, in general the effect of fertilization on the disease is just partially understood (Mulvey *et al.*, 2013). The objective of this study was to identify SNC by its morphology and evaluate the effect of chemical fertilizer and tree nutrient status on the severity and incidence levels of the disease (*i.e.* degree of infestation or intensity) in a seven-year-old *P. menziesii* plantation. The hypothesis was that there is a correlation between the nutrient status and variation in the degree of SNC infestation in *P. menziesii*.

MATERIALS AND METHODS

Morphological identification

P. gaeumannii was identified by morphology of its pseudothecia. Only pseudothecia were measured because during

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación morfológica

La identificación de *P. gaeumannii* se realizó mediante las características de morfología de los pseudotecios. Sólo se realizaron mediciones de los pseudotecios porque durante el experimento siempre se encontraron inmaduros. Las imágenes con microscopio estereoscópico (Leica® ZOOM 2000 a 45X) se analizaron con el programa IMAGE-J y se estableció una escala gráfica para realizar mediciones de estos órganos (n=130).

Sitio y establecimiento experimental

La Reserva Forestal Multifuncional “El Manantial” S. C. se ubica en la región de la “Sierra Norte” del estado de Puebla, entre los municipios de Aquixtla e Ixtacamaxtitlán, con 274.8 ha. El área de estudio está en el paraje “Sierra Mojada”, con una altitud promedio de 3000 m sobre el nivel medio del mar, en 19° 43' 17.86" N, 97° 59' 28.43" O, 19° 43' 17.61" N, 97° 59' 27.82" O, 19° 43' 19.86" N, 97° 59' 26.51" O y 19° 43' 20.66" N, 97° 59' 27.29" O. La plantación seleccionada tenía una edad de 7 años, con una densidad de 2890 árboles ha⁻¹, 10.11 cm de diámetro basal medio (a 5 cm del suelo) y 1.90 m de altura media. Los fertilizantes aplicados antes fueron Triple 16 (16-16-16), en 2012, a todos los árboles en la zona de goteo de la copa, con dos podas de formación anual; y Nitrofoska® (100 a 150 g por árbol) en 40 cm del suelo, en junio-julio de 2016. La primera detección del tizón suizo el predio fue en 2006, y se usó clorotalonil como control químico.

En noviembre de 2017 se estableció un diseño experimental en bloques al azar generalizado, se evaluaron dos factores controlados con tres niveles (factorial 3²), se consideró un árbol como unidad experimental y dos repeticiones por bloque. El factor de confusión fue el nivel visual de transparencia de copa asociado con el tizón suizo (Figura 1). El primer factor incluyó tres niveles de fertilización (urea, sulfato de potasio y control) y el segundo tuvo tres niveles de aplicación de fungicidas químicos (propiconazol, prochloraz y control). Los bloques se separaron con listones de diferente color (*i.e.* verde: bajo; anaranjado: medio; rojo: alto). Cada tratamiento tuvo seis repeticiones y hubo 54 unidades experimentales que se aleatorizaron con el programa R 3.5.2 (en el paquete *agricolae* y la función *design.ab*). La evaluación se realizó en mayo de 2018.

Tratamientos

Dosis de fertilización

Las ramillas con acículas de 2017 se recolectaron mediante un muestreo sistemático durante un recorrido en zig-zag aproximado

the experiment they were always found immature. The images taken with a stereoscopic microscope (Leica® ZOOM 2000 at 45X) were analyzed with IMAGE-J, and a graphic scale was established to measure these organs (n=130).

Site and experimental layout

The multipurpose Forest Reserve “El Manantial” S.C. is located in the Sierra Norte region of the state of Puebla, between the municipalities of Aquixtla and Ixtacamaxtitlán; it covers an area of 274.8 ha. The study site is in the area called “Sierra Mojada” at a mean altitude of 3000 m, at 19°43'17.86" N, 97° 59' 28.43" W, 19° 43' 17.61" N, 97° 59' 27.82" W, 19° 43' 19.86" N, 97° 59' 26.51" W and 19° 43' 20.66" N, 97° 59' 27.29" W. The selected plantation was 7 years old, with a density of 2890 trees ha⁻¹, mean basal diameter 10.11 cm (5 cm above the ground) and 1.90 m mean height. The fertilizers applied before were Triple 16 (16-16-16), in 2012, to all the trees in the drip zone of the crown with two annual form-pruning events, and Nitrofoska® (100 to 150 g per tree) in 40 cm depth of soil in June-July of 2016. SNC was first detected on the plantation in 2006, and chlorothalonil was used as chemical control.

In November 2017, an experimental design in generalized random blocks was set up. Two controlled factors were evaluated with three levels each (factorial 3²). One tree was the experimental unit, and two replicates per block were established. The confounding factor was the visual level of crown transparency associated with SNC (Figure 1). The first factor included three levels of fertilization (urea, potassium sulphate and the control), and the second had three levels of chemical fungicide application (propiconazole, prochloraz and the control). The blocks were separated with ribbons of different color (*i.e.* green: low, orange: medium; red: high). Each treatment had six replicates, and there were 54 experimental units which were randomized with R 3.5.2 software (in the *agricolae* package and *design.ab* function). Treatments evaluation was carried out in May 2018.

Treatments

Fertilizer doses

In 2017, twigs with needles were collected by systematic sampling on a zig-zag path of approximately 100 m. Five subsamples in four transects were obtained, and a compound sample from each transect was used. The foliage samples were collected from the upper third of the crown, from the middle part of mature, non-senescent twigs in August 2017. Samples were washed with tap water and then with distilled water. They were placed in brown paper bags to be dried in a forced circulation



Figura 1. Nivel de transparencia de copa: A) nivel bajo, B) nivel medio y C) nivel alto.
Figure 1. Crown transparency levels: A) low, B) medium and C) high.

de 100 m. Cinco submuestras en cuatro transectos se obtuvieron y se usó una muestra compuesta por cada transecto. Las muestras foliares se recolectaron del tercio superior de la copa, de la parte media de ramillas maduras, no senescentes, en agosto 2017. Las muestras se lavaron con agua potable y luego con agua destilada; se colocaron en bolsas de papel estraza, el secado se hizo en una estufa de circulación forzada marca FELISA®, a 70 °C por 72 h y se molieron en un mortero. Después se enviaron al laboratorio Salvador Alcalde Blanco, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, para determinar macronutrientos (N, P, K, Ca, Mg) y micronutrientos (Cu, Mn, B, Fe, Zn).

Las concentraciones nutrimentales foliares se interpretaron mediante las concentraciones críticas de Ballard y Carter (1986) para *P. menziesii*. Con base en los análisis foliares se definieron los tratamientos de fertilización, y se determinó que N y K son deficientes en el follaje. El cálculo de las dosis de fertilización se hizo con base en el modelo racional o modelo demanda-suministro, adaptado para concentraciones foliares: $Dosis = (demanda\ del\ cultivo - suministro\ del\ suelo) / eficiencia\ de\ recuperación\ del\ fertilizante$ (Etchevers, 1999). La dosis de los macronutrientos y micronutrientos se calculó al considerar 1 kg de biomasa foliar, y 40% de eficiencia de la fertilización para los micronutrientos, y se usó la concentración crítica de boro. Los materiales fertilizantes inorgánicos usados fueron urea, sulfato de potasio, de manera secundaria ácido fosfórico y el producto comercial Sagaquel Combi®. Las dosis de urea, ácido fosfórico y sulfato de potasio se calcularon con 1 kg de biomasa foliar, 5, 15 y 15% de eficiencia de la fertilización, respectivamente. Con base en lo anterior se decidió aplicar 10 g de urea (N) y 80 g de sulfato de potasio (K) en la zona de goteo de la copa en noviembre de 2017 (Cuadro 1); todas las unidades experimentales recibieron una dosis de 5 g de ácido fosfórico y una dosis de 15 g del producto Sagaquel Combi®.

oven FELISA®, at 70 °C for 72 h and then ground in a mortar. After that, samples were sent to the laboratory Salvador Alcalde Blanco at Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo (www.colpos.mx), to determine macronutrients (N, P, K, Ca, Mg) and micronutrients (Cu, Mn, B, Fe, Zn).

Nutrient foliage concentrations were interpreted using Ballard and Carter critical concentrations (1986) for *P. menziesii*. Fertilizer treatments were determined based on the foliage analyses, which determined that N and K were deficient in the foliage. Fertilizer dose was calculated based on the rational, or demand-supply, model adapted for leaf concentrations: $dose = (crop\ demand - soil\ supply) / efficiency\ of\ fertilizer\ recuperation$ (Etchevers, 1999). Doses of macronutrients and micronutrients were calculated considering 1 kg leaf biomass, and 40% fertilization efficiency for micronutrients, and using the boron critical concentration. The inorganic fertilizer materials used were urea and potassium sulphate, and, secondarily, phosphoric acid and the commercial product Sagaquel Combi®. The doses of urea, phosphoric acid and potassium sulphate were calculated with 1 kg leaf biomass and 5, 15, and 15% fertilization efficiency, respectively. On this basis, 10 g urea (N) and 80 g potassium sulphate (K) were applied to the crown drip zone in November 2017 (Table 1). All the experimental units received a dose of 5 g phosphoric acid and one dose of 15 g of the product Sagaquel Combi®.

Fungicide doses

The two fungicides selected to evaluate their effects were Tilt® (propiconazole) and Sportak® (prochloraz), which are not in the list of highly dangerous pesticides of the FSC® 2017 (*Forest Stewardship Council*) (FSC®, 2017). Propiconazole has very low mobility in the soil and a half-life of 55 d. Its toxicity varies from

Cuadro 1. Tratamientos de fungicidas y fertilizantes aplicados en el experimento.
Table 1. Fungicide treatments and fertilizers applied in the experiment.

Tratamiento	Propiconazol (mL L ⁻¹)	Factores		
		Prochloraz (mL L ⁻¹)	Urea (g)	Sulfato de potasio (g)
T1	0	0	0	0
T2	0	1	0	80
T3	0	1	0	0
T4	0	1	10	0
T5	1	0	0	80
T6	1	0	0	0
T7	1	0	10	0
T8	0	0	0	80
T9	0	0	10	0

Variables evaluadas. ♦ Evaluated variables.

Dosis de fungicidas

Los dos fungicidas seleccionados para evaluar sus efectos, Tilt® (propiconazol) y Sportak® (prochloraz) no están en la lista de plaguicidas altamente peligrosos del FSC® 2017 (*Forest Stewardship Council*, Consejo de Administración Forestal) (FSC®, 2017). El propiconazol tiene movilidad muy baja en el suelo, con una vida media de 55 d. Su toxicidad varía de alta a moderada para insectos y zooplancton, moderada para peces y moluscos, y ligera para crustáceos. No es tóxico para abejas. La vida media del prochloraz en el suelo es 125 d. La toxicidad de este producto es alta para algas, moderada para peces y crustáceos, y ligera para aves y abejas.

Las dosis de fungicidas fueron 1 mL de producto comercial + 2 mL del producto adherente Dap-plus® por cada litro de agua en cada unidad experimental (Cuadro 1). La aplicación de los fungicidas se realizó en noviembre y diciembre de 2017, en la copa de los árboles, con una mochila aspersora manual de la marca SWISSMEX®.

En mayo de 2018 se usaron tijeras para podar una ramilla del tercio superior de cada unidad experimental, las muestras se lavaron, se colocaron en bolsas de papel estraza y se secaron 72 h en una estufa a 70 °C; después se pesó una muestra compuesta de 100 acículas de la cohorte de edad 2017, con una balanza analítica Ohaus Serie Adventurer™ Pro y se molió en un mortero. Cada muestra se homogenizó de acuerdo con su tratamiento y su bloque, por lo que se enviaron al laboratorio 27 muestras para cuantificar macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg) y micronutrientes (Cu, Mn, B, Fe, Zn). Con los resultados del análisis de laboratorio se evaluó el contenido nutrimental foliar expresado en mg (concentración × peso seco de 100 acículas / 100).

high to moderate for insects and zooplankton, moderate for fish and mollusks, and slight for crustaceans. It is not toxic for bees. Half-life of Prochloraz in the soil is 125 d. Toxicity of this product is high for algae, moderate for fish and crustaceans, and slight for birds and bees.

The doses of fungicides were 1 mL of commercial product + 2 mL of the adherent product Dap-plus® per liter of water on each experimental unit (Table 1). Fungicides were applied in November and December 2017 on the tree crown with a SWISSMEX® backpack sprayer.

Evaluated variables

In May 2018, a twig from the upper third of each experimental unit was cut off with scissors. The samples were washed, placed in brown paper bags and dried for 72 h in an oven at 70 °C. After drying, a compound sample of 100 needles of the 2017 age cohort was weighed on an analytical balance Ohaus Serie Adventurer® Pro and ground in a mortar. Each sample per treatment and block was homogenized, and the 27 samples were sent to the laboratory for quantification of macronutrients (N, P, K, Ca, Mg) and micronutrients (Cu, Mn, B, Fe, Zn). With the results of the laboratory analyses, leaf nutrient content, expressed in mg, was evaluated (concentration × dry weight of 100 needles / 100).

In order to evaluate the intensity of SNC (incidence and severity), the methodology of Hansen *et al.* (2000) was used with modifications. The samples were adhered to letter-size cardboard (21.6 cm x 27.9 cm) with double-sided adhesive tape so that the abaxial side of the needles was on top. From each cohort (needle age), 30 leaves were selected at random to evaluate incidence (presence or absence of the pathogen), and 10 needles were checked to evaluate severity by thirds. For severity, the

Para evaluar el grado de infección por el tizón suizo (incidencia y severidad) se utilizó la metodología de Hansen *et al.* (2000), con modificaciones. Las muestras se adhirieron a cartulinas tamaño carta (21.6 cm x 27.9 cm) con cinta doble cara para que la superficie abaxial de las acículas quedara hacia arriba. De cada cohorte (edad de las acículas) se seleccionaron 30 hojas al azar para evaluar la incidencia (presencia o ausencia del patógeno) y se revisaron 10 acículas para evaluar la severidad por tercios. Para la severidad se realizaron recuentos de la proporción de estomas ocluidos por pseudotecios (densidad de pseudotecios) en tres ubicaciones distintas a lo largo de cada acícula dividida en tres secciones de igual longitud (base, media y punta). En cada tercio se seleccionó un punto de inicio aleatorio para el recuento y examen de 100 estomas (50 a cada lado de la nervadura central), y se registró el número de estomas ocluidos por pseudotecios.

Los recuentos de pseudotecios se realizaron con un contador manual en un microscopio estereoscópico Leica® ZOOM 2000 a 45X. La severidad e incidencia se calculó por cada acícula y cohorte de edad en cada árbol, para proporcionar una mejor estimación de la densidad media de pseudotecios (Figura 2).

Análisis estadístico

Con los datos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), una matriz de correlaciones y un análisis de correlación canónica entre las variables contenido nutrimental del follaje y los niveles de incidencia y severidad de la enfermedad. Ambas cohortes de edad del follaje, en su conjunto (2016 y 2017), se usaron para representar las dos variables de la intensidad del tizón suizo y siete variables para el estado nutrimental de los árboles (Cuadro 2). Los

proportion of stomata occluded by pseudothecia (pseudothecia density) was counted in three different locations along each needle divided into three longitudinal sections (base, middle, and tip). In each third, a random initial point was selected for counting and examination of 100 stomata (50 on each side of the central midrib), and the number of stomata occluded by pseudothecia was recorded.

Pseudothecia were counted with a manual counter under a stereoscopic microscope Leica® ZOOM 2000 at 45X. Severity and incidence were calculated for each needle and age cohort on every tree to provide a better estimation of the mean density of pseudothecia (Figure 2).

Statistical analysis

With the data, an analysis of variance (ANOVA), a matrix of correlations, and an analysis of canonic correlation were performed on the variables foliage nutrient content and the levels of incidence and severity of the disease. Both foliage age cohorts (2016 and 2017) were used together to represent the two variables of SNC intensity and seven variables for nutrient status of the trees (Table 2). Leaf analyses were interpreted with Ballard and Carter (1986) critical concentrations at the end of the experiment. The analyses were carried out with R v. 3.5.2 (R Core Team, 2018) and SAS® v. 9.4 (SAS Institute Inc., 2013).

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological identification

Phaeocryptopus gaeumannii was identified as the causal agent of SNC by pseudothecia morphology

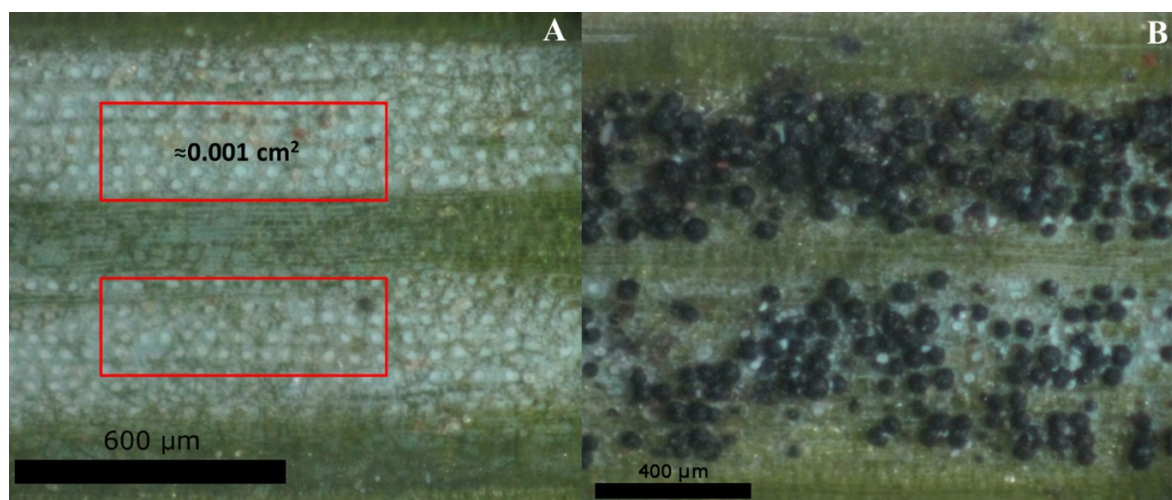


Figura 2. Acículas de las cohortes de edad A) 2017 y B) 2016; el área evaluada para medir la severidad es cerca de 0.001 cm²; hay alrededor de 5000 estomas cm⁻².

Figure 2. Age cohorts of needles A) 2017 and B) 2016; the area evaluated to measure severity is nearly 0.001 cm²; there are around 5000 stomata cm⁻².

análisis foliares se interpretaron con las concentraciones críticas de Ballard y Carter (1986) al final del experimento. Los análisis se realizaron en los programas R v. 3.5.2 (R Core Team, 2018) y SAS® v. 9.4 (SAS Institute Inc., 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación morfológica

Phaeocryptopus gaeumannii se identificó como el agente causal del tizón suizo por medio de la morfología de los pseudotecios y la sintomatología de las acículas de *P. menziesii*. Los síntomas y signos mencionados por Hansen *et al.* (2000), Stone *et al.* (2008), y Cibrián *et al.* (2014) se corroboraron. Los pseudotecios miden (43-) 55 (-72) μm de diámetro.

Análisis estadístico

Análisis de correlaciones canónicas (ACC) y ANDEVA

En el análisis se realizaron transformaciones para normalizar las variables N, Mn y Cu con la transformación de Box-Cox; la severidad (2016-2017) y la incidencia (2016-2017) con la función arcoseno-raíz cuadrada, para obtener una distribución normal multivariada del conjunto de datos.

El ANDEVA no mostró diferencias estadísticas significativas para las variables incidencia y severidad. Pero el análisis de correlaciones entre las variables originales muestra que las relaciones lineales significativas mayores ($p \leq 0.05$) se generaron entre Ca-incidencia ($R = -0.47$), Mn-Incidencia ($R = -0.43$) e Incidencia-Severidad ($R = 0.61$) (Figura 3). La concentración de N tuvo una relación mediana con la incidencia del tizón ($R = 0.42$), lo cual coincide con hallazgos de Lan *et al.* (2019) y El-Hajj *et al.* (2004). La relación entre incidencia y severidad de la enfermedad es relevante porque cualquier relación cuantificable entre ellas permitiría estimar la severidad a partir de los valores de incidencia (McRoberts *et al.*, 2003).

La primera correlación canónica fue estadísticamente significativa ($p = 0.01$), con $R = 0.84$ y explica el 92% de la variabilidad.

La segunda variable canónica no resultó significativa ($p = 0.71$), con $R = 0.41$.

Los estadísticos multivariados y las aproximaciones de F fueron significativos ($p \leq 0.05$) para la primera correlación canónica (Cuadro 3).

Cuadro 2. Variables asociadas mediante el análisis de correlación canónica.

Table 2. Variables associated by the canonic correlation analysis.

Variables asociadas al tizón	Variables nutrimentales
Severidad (Y1)	Nitrógeno (X1)
Incidencia (Y2)	Potasio (X2)
	Calcio (X3)
	Magnesio (X4)
	Cobre (X5)
	Manganeso (X6)
	Boro (X7)

and *P. menziesii* needle symptomatology. The signs and symptoms mentioned by Hansen *et al.* (2000), Stone *et al.* (2008), and Cibrián *et al.* (2014) were corroborated. The pseudothecia measured (43-) 55 (-72) μm in diameter.

Statistical analysis

Analysis of canonic correlations (ACC) and ANOVA

In the analysis, transformations were performed to normalize the variables N, Mn and Cu with Box-Cox transformation. Severity (2016-2017) and incidence (2016-2017) were normalized with the arcsine-square root function to obtain a normal multivariate distribution of the set of data.

The ANOVA did not reveal significant statistical differences for the variables incidence and severity. But the correlation analysis between pairs of the original variables showed that most of the significant linear relationships ($p \leq 0.05$) were generated between Ca-incidence ($R = -0.47$), Mn-incidence ($R = -0.43$), and Incidence-Severity ($R = 0.61$) (Figure 3). N concentration had a medium relationship with SNC incidence ($R = 0.42$), coinciding with the findings of Lan *et al.* (2019) and El-Hajj *et al.* (2004). The relationship between incidence and severity of the disease is relevant because any quantifiable relationship between them enables estimating severity from the incidence values (McRoberts *et al.*, 2003).

The first canonic correlation was statistically significant ($p = 0.01$), with $R = 0.84$, and explains 92% of the variability. The second canonic variable was not significant ($p = 0.71$), with $R = 0.41$.

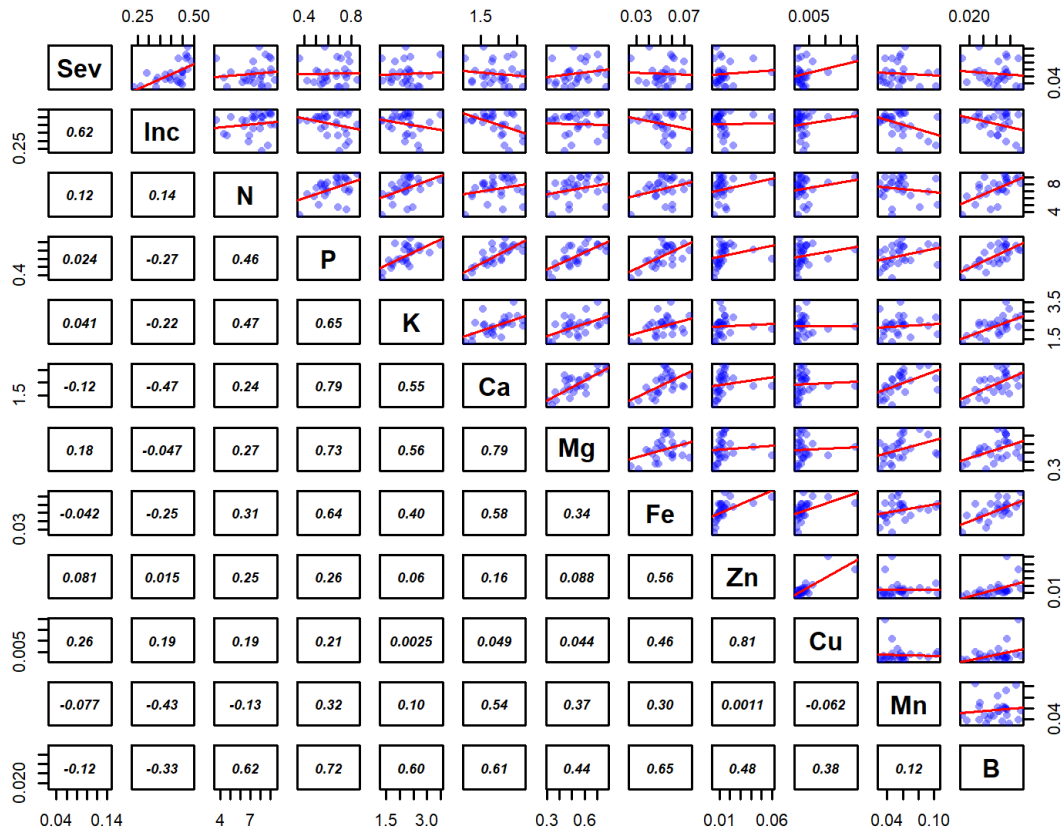


Figura 3. Matriz de diagramas de dispersión y correlación del contenido nutricional foliar y la intensidad del tizón suizo.
Figure 3. Matrix of dispersion diagrams and correlation of leaf nutrient content with intensity of Swiss needle cast.

La correlación de la variable canónica del tizón (VCT) y la incidencia fue mayor que con la severidad y el contenido de Ca y Mn, esta última negativa (Cuadro 4). La variable canónica de los nutrientes se correlacionó mejor con la incidencia, y estuvo más influenciada por el Ca y el Mn y menos influenciada por Cu, Mg y N. Al aumentar la variable canónica de los nutrientes (VCN), también aumentaron las concentraciones foliares de Ca y B, pero disminuyeron

The multivariate statistics and the F approximations were significant ($p \leq 0.05$) for the first canonic correlation (Table 3).

Correlation of the canonic SNC variable (VCT) with incidence was higher than that of severity with Ca and Mn content, and was negative with Mn content (Table 4). The canonic variable of the nutrients correlated better with incidence and was more influenced by Ca and Mn and less influenced

Cuadro 3. Estadísticos multivariados y valor de p de la primera correlación canónica.
Table 3. Multivariate statistics and p value of the first canonic correlation.

Estadístico	Valor	F	GL	GL Den.	p
Lambda de Wilks	0.293	2.68	12	38	0.0115
Traza de Pillai	0.798	2.21	12	40	0.0381
Traza de Hotelling-Lawley	2.099	3.22	12	26.63	0.0059
Raíz Máxima de Roy	1.938	6.46	12	20	0.0006

las de Mn. Esto significa que las concentraciones foliares bajas de Mn se relacionan con incidencia y severidad mayores.

De acuerdo con Huber *et al.* (2012), la influencia del Ca sobre la incidencia puede estar afectada por el ácido abscísico, pues dicho nutrimento actúa como segundo mensajero y promueve la cantidad de ácido abscísico y etileno que provoca la caída de las acículas; o quizás por la reducción de la conductancia al mantener los estomas “cerrados”. La deficiencia de potasio aumenta la susceptibilidad de las plantas huésped a los parásitos obligados y facultativos (Huber *et al.*, 2012). Evidencias existen de que severidad e incidencia de *P. gaeumannii* se asocian en forma negativa con la concentración nutrimental foliar del Mn en el abeto Douglas, aunque no hay relación con la concentración foliar de Ca (Lan *et al.*, 2019).

Hay estudios sobre los efectos de N y K en la inducción de resistencia a enfermedades vegetales, pero los resultados para N pueden ser inconsistentes, y algunos son controvertidos por varias razones: no se establecen claramente si el suministro de estos nutrimentos era bajo, óptimo o excesivo, o si el efecto dependía de la fuente del N suministrado (*i.e.* amonio o nitrato); o no se consideraron las diferencias en los patrones de infección entre parásitos obligados y facultativos (Huber *et al.*, 2012). Amtmann *et al.* (2008) realizaron una compilación donde muestran que la aplicación de fertilizantes potásicos disminuyó la incidencia de enfermedades en la mayoría de los estudios, pero en otras investigaciones no se tuvo ningún efecto e inclusive se observó un efecto adverso en algunos experimentos.

Las enfermedades bióticas pueden provocar una interrupción grave de la absorción y la translocación de nutrimentos, pero también pueden modificar las concentraciones nutrimentales en los tejidos vegetales (Walters, 2015). Una enfermedad que podría provocar un aumento en los niveles de ácido abscísico es el amarillamiento letal del cocotero, causada por fitoplasmas, la cual conduce al cierre permanente de los estomas y origina disminución de la fotosíntesis, clorosis de las hojas e incluso, la muerte de las plantas (Walters, 2015).

En los diagramas de cajas se observa la relación del contenido nutrimental foliar con el nivel de transparencia de la copa; los árboles con mayor nivel de raleo tuvieron un contenido nutrimental foliar menor en comparación con los niveles de transparencia medio

Cuadro 4. Correlaciones entre las variables originales y variables canónicas.

Table 4. Correlations between original variables and canonic variables.

Variables originales	Variables canónicas	
	VCT	VCN
Severidad (Y1)	0.58	0.48
Incidencia (Y2)	0.99	0.83
Nitrógeno (X1)	-0.13	-0.15
Potasio (X2)	0.23	0.27
Calcio (X3)	0.48	0.57
Magnesio (X4)	0.06	0.07
Cobre (X5)	-0.04	-0.05
Manganeso (X6)	-0.42	-0.51
Boro (X7)	0.34	0.40

VCT: variable canónica asociada al tizón suizo; VCN: variable canónica asociada al contenido nutrimental foliar. ♦ VCT: canonic variable associated with SNC; VCN: canonic variable associated with leaf nutrient content.

by Cu, Mg and N. As the nutrient canonic variable (VCN) increased, leaf Ca and B concentrations also increased, but Mn concentrations decreased. This means that low leaf Mn concentrations are associated with higher incidence and severity.

According to Huber *et al.* (2012), the effect of Ca on incidence may be influenced by abscisic acid, since Ca acts as a second messenger and promotes amounts of abscisic acid and ethylene that cause needles to drop, or possibly, there is a reduction in conductance because the stomata are obstructed. Potassium deficiency increases susceptibility of host plants to obligate and facultative parasites (Huber *et al.*, 2012). There is evidence that *P. gaeumannii* severity and incidence is associated negatively with leaf Mn nutrient concentration in Douglas fir, but there is no relation to leaf Ca concentration (Lan *et al.*, 2019).

Studies have been conducted on the effects of N and K on induction of resistance to plant diseases, but the results for N can be inconsistent. Some results are controverted for several reasons. They do not clearly establish whether nutrient supply was low, optimal or excessive or whether the effect depended on the N supply source (*i.e.* ammonium or nitrate); nor did they consider differences in the infection patterns between obligate or facultative parasites (Huber *et al.*, 2012). Amtmann *et al.* (2008) compiled studies, most of which show that application of potassium

y bajo, y el efecto fue más notorio con el contenido de Ca (Figura 4). El Ca se asocia con los niveles de transparencia de la copa, y es probable que tuviera un efecto supresivo contra la caída de follaje, la cual se relaciona con la presencia del tizón suizo en el sitio; la densidad de la copa es un buen indicador de la tolerancia a esta enfermedad (Temel *et al.*, 2004).

El Mn tiene una influencia positiva en el control de enfermedades y puede ser la razón de la correlación negativa con la incidencia del tizón y su variable canónica. El Mn es probablemente el micronutriente más estudiado en cuanto al desarrollo de la resistencia/tolerancia a enfermedades foliares y de raíz (Graham y Webb, 1991). Dicho nutriente es importante en la síntesis de clorofila y está involucrado en la activación de enzimas (como descarboxilasas y deshidrogenasas) (Núñez, 2013). La función de este elemento en la resistencia/tolerancia a enfermedades está relacionada con la ruta metabólica del ácido shikímico (Huber y Haneklaus, 2007). El Mn interviene como cofactor para varias enzimas en la biosíntesis de metabolitos secundarios asociados a ellas, como flavonoides, fitoalexinas, precursores de la lignina e inclusive forma parte del ingrediente activo de algunos fungicidas (Dordas, 2008). Velázquez-

fertilizers decreased the incidence of diseases, but other studies did not show any effect, or even showed an adverse effect in some of the experiments.

Biotic diseases can cause serious interruption to nutrient absorption and translocation, but they can also modify nutrient concentration in plant tissues (Walters, 2015). A disease that can cause an increase in abscisic acid is the lethal yellowing of the coconut tree caused by phytoplasmas, which leads to permanent closing of the stomata, and originates a decrease in photosynthesis, leaf chlorosis and even death of the plants (Walters, 2015).

The box diagrams show the relation of leaf nutrient content and crown transparency. The trees that were more transparent had a lower content of nutrients than those that had medium and low transparency. The effect was most notable with Ca content (Figure 4). Ca is associated with levels of crown transparency, and it is likely that it has a suppressive effect on foliage abscission, which is related to presence of SNC in the site. Crown density is a good indicator of tolerance to this disease (Temel *et al.*, 2004).

Mn has a positive influence in controlling disease and could be the reason for the negative correlation between SNC incidence and its canonic variable.

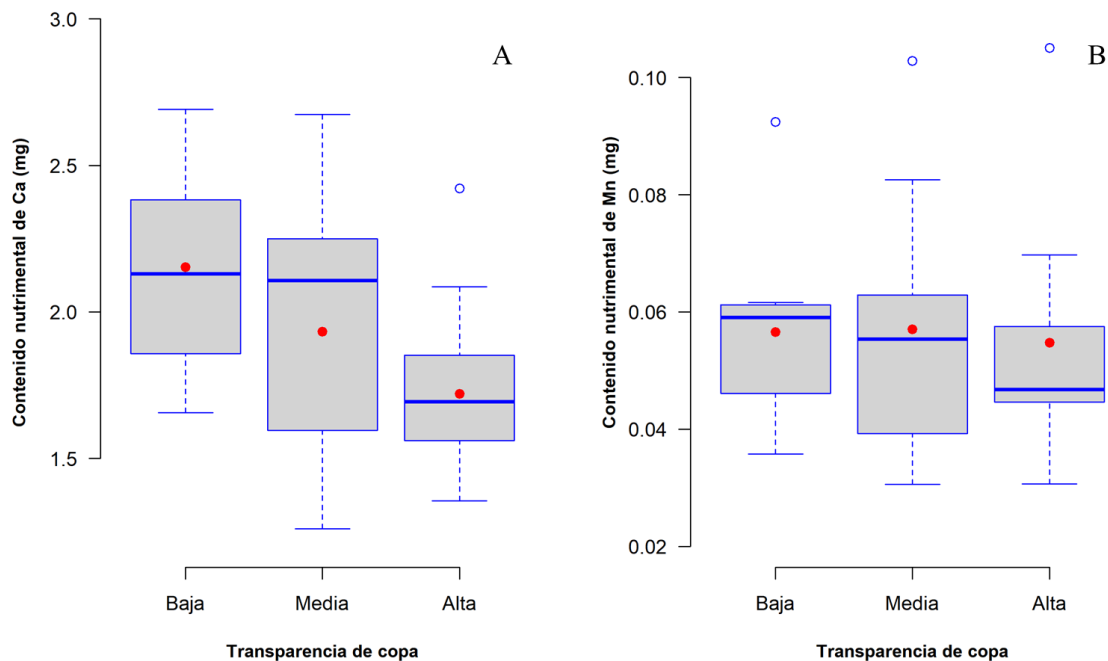


Figura 4. Contenido nutricional foliar de A) Ca, y B) Mn para cada nivel de transparencia de copa en *P. menziesii*.
Figure 4. Leaf nutrient content of A) Ca and B) Mn for each level of *P. menziesii* crown transparency.

Mendoza *et al.* (2017) documentaron el efecto inhibitorio *in vitro* del Mn, junto con Cu y Zn, sobre una cepa de *P. gaeumannii* en México.

La aplicación de Mn, Cu y B activa los mecanismos SAR (*systemic acquired resistance*, resistencia sistémica adquirida) y libera los cationes Ca^{2+} de las paredes celulares que interactúan con el ácido salicílico y activan el mecanismo de defensa en las plantas (Gupta *et al.*, 2017). Al aumentar la incidencia de la enfermedad, la concentración de Mn en los tejidos del hospedero disminuye (relación inversamente proporcional). Mecanismos diversos se proponen para explicar la función del Mn en la resistencia a enfermedades, como la lignificación, la síntesis de fenoles solubles, la inhibición de aminopeptidasas, la fotosíntesis (severamente reducida por la deficiencia de Mn), y la inhibición directa de patógenos, ya que estos últimos lo requieren en cantidad mucho menor (Graham and Webb, 1991).

El Ca forma parte de los metales alcalinos y alcalinotérreos, funciona como mensajero secundario y es importante para la división celular y en la estabilidad de la membrana y pared celular (Núñez, 2013). Cuando hay una invasión de patógenos, de inmediato hay un cambio en el potencial de membrana y aumenta en el citoplasma la concentración de Ca, el cual actúa como un segundo mensajero. Por lo tanto, las proteínas transportadoras de Ca pueden estar involucradas en las primeras señales de defensa (Yang *et al.*, 1997). También el Ca es esencial para la estabilidad de las biomembranas, la deficiencia de Ca aumenta el flujo de salida de los compuestos de bajo peso molecular (como azúcares) del citoplasma hacia el apoplasto, donde estos compuestos pueden estar disponibles para el uso de patógenos; además la actividad de enzimas como las poligalacturonasas se inhibe por el Ca (Huber *et al.*, 2012).

De acuerdo con Huber *et al.* (2012), el aumento de la concentración de K no conduce a un incremento en la infección o intensidad de una enfermedad (o viceversa), siempre que la concentración de Ca sea alta; por lo tanto, la razón K:Ca debe mantenerse cercana a uno para minimizar los daños.

Análisis nutrimental

La comparación de los valores iniciales con los finales, con base en las concentraciones críticas de Ballard y Carter (1986), mostró un aumento en las

Mn is probably the most studied micronutrient in resistance / tolerance development to leaf and root diseases (Graham and Webb, 1991). Mn is important in the synthesis of chlorophyll and is involved in enzyme activity (such as decarboxylases and dehydrogenases) (Nuñez, 2013). The function of this element in resistance/tolerance to disease is related to the metabolic route of shikimic acid (Huber and Haneklaus, 2007). Mn intervenes as a cofactor for several enzymes in the biosynthesis of Mn-associated secondary metabolites, such as flavonoids, phytoalexins, and lignin precursors, and it also forms part of the active ingredient of some fungicides (Dordas, 2008). Velázquez-Mendoza *et al.* (2017) reported the *in vitro* inhibitory effect of Mn, altogether with Cu and Zn, on a *P. gaeumannii* strain in Mexico.

Application of Mn, Cu and B activates SAR (*systemic acquired resistance*) mechanisms and releases Ca^{2+} cations from the cell walls that interact with salicylic acid and activate plant defense mechanisms (Gupta *et al.*, 2017). When incidence of the disease increases, the Mn concentration in host tissues decreases (inversely proportional). Diverse mechanisms are proposed to explain the function of Mn in resistance to disease, such as lignification, synthesis of soluble phenols, inhibition of aminopeptidasas, photosynthesis (which is severely reduced by Mn deficiency), and direct inhibition of the pathogens; since they require Mn in a much lower amount (Graham and Webb, 1991).

Ca belongs to the group of alkali and alkaline-earth metals. It functions as a secondary messenger and is important for cell division and stability of cell membrane and cell wall (Nuñez, 2013). When pathogens invade, there is an immediate change in the membrane potential and Ca concentration increases in the cytoplasm. Therefore, Ca-transporting proteins may be involved in the first signals of defense (Yang *et al.*, 1997). Also, Ca is essential for stability of bio-membranes; Ca deficiency increases the outflow of compounds of low molecular weight (such as sugars) from the cytoplasm towards the apoplast, where these compounds are available for use by the pathogen. Moreover, the activity of enzymes, such as polygalacturonase, is inhibited by Ca (Huber *et al.*, 2012).

According to Huber *et al.* (2012), an increase in K does not lead to an increase in infection or disease

concentraciones de los nutrimentos aplicados (N y K). En el tratamiento de urea se sobrepasó la concentración crítica, y en el de sulfato de potasio hubo un aumento considerable respecto al inicio del experimento; además hubo un efecto antagónico entre los fertilizantes y los fungicidas (Cuadro 5). El tratamiento de urea fue el único que alcanzó la concentración crítica de N; en cambio, P, K y Mg fueron deficientes para todos los tratamientos y el Ca se mantuvo en un estado de suficiencia en todos los tratamientos.

Cuando los plaguicidas se combinan con fertilizantes, aditivos u otros plaguicidas, pueden causar interacciones químicas, como sinergismo, aditividad y antagonismo (Cereza *et al.*, 2019). En un experimento *in vitro* desarrollado por Padhy *et al.* (2014) para *Cylindrospermum* sp., los fertilizantes químicos mezclados con insecticidas fueron antagonistas.

CONCLUSIONES

La diferencia entre los tratamientos, sobre la incidencia y severidad del tizón suizo no fue significativa, pero la concentración foliar de nitrógeno y la incidencia del tizón mostraron una correlación directamente proporcional.

Los contenidos de calcio y manganeso fueron las variables nutrimentales principales en asociación inversa con la severidad e incidencia de la enfermedad. Los contenidos de magnesio, cobre y nitrógeno se correlacionaron en menor medida.

intensity (or *vice versa*), when Ca concentration is high; thus, the K:Ca ratio should be near one to minimize damages.

Nutrient analysis

Comparison of initial and final values, based on Ballard and Carter's (1986) critical concentrations, showed an increase in concentrations of the applied nutrients (N and K). In the urea treatment, N surpassed the critical concentration, and in the potassium sulphate treatment, there was a notable increase relative to the concentration at the beginning of the experiment. Moreover, there was an antagonistic effect between the fertilizers and fungicides (Table 5). The urea treatment was the only one that reached the critical N concentration, while P, K and Mg were deficient in all the treatments, and Ca was sufficient in all the treatments.

When pesticides combine with fertilizers, additives or other pesticides, chemical interactions, such as synergism, additivity and antagonism, can occur (Cereza *et al.*, 2019). In an *in vitro* experiment conducted by Padhy *et al.* (2014) on *Cylindrospermum* sp., chemical fertilizers mixed with insecticides were antagonistic.

CONCLUSIONS

Differences among the fertilizer treatments on incidence and severity of Swiss needle cast were not

Cuadro 5. Diagnóstico nutrimental, de acuerdo con las concentraciones críticas de Ballard y Carter (1986).

Table 5. Nutrient diagnosis, according to Ballard and Carter's (1986) critical concentration.

Referencia/tratamiento	N (%)	P (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	Mg (ppm)
Ballard y Carter (1986)	1.450	0.150	0.800	0.250	0.120
Análisis preliminar (2017)	1.435 [§]	0.150 [‡]	0.320 [§]	0.263 [†]	0.107 [§]
Testigo (T1)	1.318 [§]	0.115 [§]	0.383 [§]	0.383 [†]	0.091 [§]
Prochloraz + Sulfato de Potasio (T2)	1.342 [§]	0.111 [§]	0.402 [§]	0.359 [†]	0.103 [§]
Prochloraz (T3)	1.344 [§]	0.105 [§]	0.378 [§]	0.298 [†]	0.091 [§]
Prochloraz + Urea (T4)	1.418 [§]	0.108 [§]	0.390 [§]	0.334 [†]	0.098 [§]
Propiconazol + Sulfato de Potasio (T5)	1.318 [§]	0.110 [§]	0.387 [§]	0.329 [†]	0.103 [§]
Propiconazol (T6)	1.330 [§]	0.126 [§]	0.368 [§]	0.336 [†]	0.091 [§]
Propiconazol + Urea (T7)	1.365 [§]	0.124 [§]	0.385 [§]	0.401 [†]	0.106 [§]
Sulfato de Potasio (T8)	1.088 [§]	0.123 [§]	0.454 [§]	0.380 [†]	0.108 [§]
Urea (T9)	1.505 [†]	0.114 [§]	0.404 [§]	0.337 [†]	0.087 [§]

†: suficiente; ‡: adecuado; §: deficiente. ♦ †: sufficient; ‡: adequate; §: deficient.

Entre los tratamientos aplicados y sus efectos en la concentración y el contenido foliar nutrimental se observaron antagonismos y sinergismos. Los fungicidas influyeron en la absorción, transporte y asimilación de los nutrimentos. Este es el primer estudio en México, sobre el tipo de asociación entre una enfermedad foliar forestal y el contenido nutrimental foliar de su hospedero.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento académico y de investigación otorgado a I.F. Quiroz-Ibañez. Al Ing. León Jorge Castaños Martínez y al Ing. Salvador Castro Zavala, por el permiso para llevar a cabo esta investigación en la Reserva Forestal Multifuncional "El Manantial" S.C., con el apoyo de su personal de campo. A los Ingenieros Claudia de los Ángeles López Arias, Sergio Arturo Tafoya Gallardo y Osiel Castillo Olivas por el apoyo en laboratorio.

LITERATURA CITADA

- Amtmann, A., S. Troufflard, and P. Armengaud. 2008. The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiol. Plant.* 133: 682-691.
- Ballard, T. M., and R. E. Carter. 1986. Evaluating forest stand nutrient status. B.C. Ministry of Forests Land Management Report No. 20, Queen's Printer Publications. Victoria, British Columbia. 60 p.
- Binkley, D., and R. F. Fisher. 2013. *Ecology and Management of Forest Soils*. 4th ed. Wiley-Blackwell. Oxford. 347 p.
- Cereza, T. V., F. S. Carlos, C. Ogoshi, F.M. Tomita, G. C. Soares, and A. D. R. Ulguim. 2019. Antagonism between fungicide-insecticide treatments and dietholate in irrigated rice seeds. *J. Seed Sci.* 41: 13-21.
- Cibrián T., D., O. A. Pérez-Vera, S. E. García D., V. D. Cibrián L., J. Cruz J., y G. Hernández A. 2014. Tizón suizo *Phaeo-cryptopus gaemannii* Rhode Petrak en *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* Beissn. Mayr. *Rev. Mex. Cienc. For.* 5: 104-118.
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2017. Ficha informativa sobre árboles de navidad. Producción nacional de árboles de navidad. Coordinación general de producción y productividad gerencia de desarrollo de plantaciones forestales comerciales. 4 p.
- Domínguez A., F. A. 2015. Integración de Conocimientos de *Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco en México. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. 374 p.
- Dordas, C. 2008. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. *Agron. Sustainable Develop.* 28: 33-46.
- El-Hajj, Z., K. Kavanagh, C. Rose, and Z. Kanaan-Atallah. 2004. Nitrogen and carbon dynamics of a foliar biotrophic fungal parasite in fertilized Douglas-fir. *New Phytol.* 163: 139-147.
- Etchevers B., J. D. 1999. Técnicas de diagnóstico útiles en la medición de la fertilidad del suelo y el estado nutrimental de los cultivos. *Terra Latinoam.* 17: 209-219.
- FSC (Forest Stewardship Council). 2017. FSC List of 'highly hazardous' pesticides. Forest Stewardship Council, A.C. 22 p.
- Graham, R. D., and M. J. Webb. 1991. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. *In: Mortvedt, J. J., F. R. Cox, L. M. Shuman, and R. M. Welch (eds.). Micronutrients in Agriculture*. 2nd ed. Soil Science Society of America. USA. pp: 329- 370.
- Gupta, N., S. Debnath, S. Sharma, P. Sharma, and J. Purohit. 2017. Role of nutrients in controlling the plant diseases in sustainable agriculture. *In: Meena, V. S., P. K., Mishra, J. K., Bisht, and A. Pattanayak (eds.). Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture, Volume 2: Applications in Crop Production and Protection*. Springer, Singapore. pp: 217-262.
- Hansen, E. M., J. Stone, B. Capitano, R. Rosso, W. Sutton, I. Winton, A. Kanaskie, and M. McWilliams. 2000. Incidence and impact of Swiss needle cast in forest plantations of Douglas-fir in coastal Oregon. *Plant Dis.* 84: 773-778.
- Hansen, E. M., y K. J. Lewis. 2003. Plagas y Enfermedades de las Coníferas. APS. Mundi-Prensa. España. 101 p.
- Huber, D. M., and R. D. Graham. 1999. The role of nutrition in crop resistance and tolerance to disease. *In: Rengel, Z. (ed.). Mineral Nutrition of Crops Fundamental Mechanisms and Implications*. Food Product Press, New York. pp: 205-226.
- Huber, D. M., and S. Haneklaus. 2007. Managing nutrition to control plant disease. *Landbauforsch. Volk.* 57: 313-322.
- Huber, D., V. Römhel, and M. Weinmann. 2012. Relationship between nutrition, plant diseases and pests. *In: Marschner, H. (ed). Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3rd ed. Academic Press. London. pp: 283-298.

—End of the English version—



- Lan, Y. H., Shaw, D. C., G. Ritóková, and J. A. Hatten. 2019. Associations between Swiss needle cast severity and foliar nutrients in young-growth Douglas-fir in coastal western Oregon and southwest Washington, USA. *For. Sci.* 20: 1-6.
- Manter, D. K., B. J. Bond, K. L. Kavanagh, P. H. Rosso, and G. M. Filip. 2000. Pseudothecia of Swiss needle cast fungus, *Phaeocryptopus gaeumannii*, physically block stomata of Douglas fir, reducing CO₂ assimilation. *New Phytol.* 148: 481-491.
- McRoberts, N., Hughes, G., and Madden, L. V. 2003. The theoretical basis and practical application of relationships between different disease intensity measurements in plants. *Ann. Appl. Biol.* 142: 191-211.
- Morales, R., E. Sanfuentes, I. Vives, y E. Molina. 2012. *Phaeocryptopus gaeumannii*, patógeno causante del "swiss needle cast" en *Pseudotsuga menziesii*: antecedentes de su biología, medidas de control y situación en Chile. *Bosque.* 33: 127-134.
- Mulvey, R. L., D. C. Shaw, and D. A. Maguire. 2013. Fertilization impacts on Swiss needle cast disease severity in western Oregon. *For. Ecol. Manag.* 287: 147-158.
- Núñez E., R. 2013. El suelo como medio natural en la nutrición de los cultivos. In: Alcántar, G. G., y L. I. Trejo T. (eds). *Nutrición de Cultivos*. BBB. Biblioteca Básica de Agricultura. México. pp: 94-149.
- Padhy, R. N., N. Nayak, and S. Rath. 2014. Antagonism at combined effects of chemical fertilizers and carbamate insecticides on the rice-field N₂-fixing cyanobacterium *Cylindrospermum* sp. *in vitro*. *Interdiscip. Toxicol.* 7: 5-11.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. (Consulta: mayo 2019).
- SAS Institute Inc. 2013. SAS® 9.4 Statements: Reference. Cary, NC: SAS Institute Inc. 460 p.
- Stone, J. K., B. R. Capitano, and J. L. Kerrigan. 2008. The histopathology of *Phaeocryptopus gaeumannii* on Douglas-fir needles. *Mycologia* 100: 431-444.
- Temel, F., G. R. Johnson, and J. K. Stone. 2004. The relationship between Swiss needle cast symptom severity and level of *Phaeocryptopus gaeumannii* colonization in coastal Douglas-fir *Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*. *For. Pathol.* 34: 383-394.
- Velázquez-Mendoza, J., O. J. Salgado-Feregrino, M. D. J. Yáñez-Morales, y M. Jiménez-Casas. 2017. Primer reporte *in vitro* del efecto de nutrimentos y del silicio en el crecimiento de *Phaeocryptopus gaeumannii*, un patógeno de *Pseudotsuga menziesii*. *Rev. Mex. Fitopatol.* 35: 139-149.
- Videira, S. I. R., J. Z. Groenewald, C. Nakashima, U. Braun, R. W. Barreto, P. J. G. M. de Wit, and P. W. Crous. 2017. Mycosphaerellaceae – chaos or clarity? *Studies Mycol.* 87: 257-421.
- Walters, D. 2015. *Physiological Responses of Plants to Attack*. John Wiley & Sons. New Jersey. Sons. 229 p.
- Yang, Y., J. Shah, and D. F. Klessig. 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11: 1621-1639.

EFFECTO ANTIFÚNGICO *in vitro* DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Capsicum* spp. EN *Moniliophthora roreri*

In vitro ANTIFUNGAL EFFECT OF METHANOLIC EXTRACTS OF *Capsicum* spp. ON *Moniliophthora roreri*

Dario De la Cruz-Ricardez¹, Carlos F. Ortiz-García^{1*}, Luz del C. Lagunes-Espinoza¹, Magdiel Torres-de la Cruz²

¹ Producción Agroalimentaria en el Trópico. Campus Tabasco. Colegio de Postgraduados. 86500. Cárdenas, Tabasco, México. (cfortiz@colpos.mx). ²División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa-Cárdenas, Km 0.5, 86039, Villahermosa, Tabasco, México.

RESUMEN

Uno de los principales problemas fitosanitarios en la producción de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Latinoamérica y en México es la moniliasis, causada por *Moniliophthora roreri*. Este fitopatógeno causa más del 75% de pérdidas en la producción anual. Los metabolitos secundarios del género *Capsicum* tienen efectos antifúngicos, por lo que se pueden usar para el control de *M. roreri*. El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto *in vitro* de extractos metanólicos (EM) de tres especies de *Capsicum* sobre *M. roreri*. Los EM extraídos de frutos inmaduros de *C. chinense*, *C. frutescens*, y dos morfotipos de *C. annuum* var. *glabriusculum* se probaron a dos concentraciones: 1000 y 2500 mg L⁻¹, y se evaluaron en la inhibición del crecimiento micelial, la esporulación y la viabilidad de conidios producidos de *M. roreri*. Ambas dosis (tratamientos) se establecieron bajo un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones; cada caja de Petri fue una unidad experimental, los datos se analizaron con ANDEVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). *Moniliophthora roreri* fue sensible a los EM de las tres especies. Los EM de *C. annuum* var. *glabriusculum* en sus morfotipos amashito (AM) y garbanzo (GA) a 2500 mg L⁻¹ inhibieron el crecimiento micelial hasta en 95%. Los EM de *C. annuum* var. *glabriusculum* AM y GA a 2500 mg L⁻¹ inhibieron totalmente la producción de conidios en ambas concentraciones. Los EM de *C. chinense* y *C. annuum* var. *glabriusculum* GA inhibieron hasta 35% la viabilidad de conidios de *M. roreri*. La sensibilidad *in vitro* de *M. roreri* a EM de *C. annuum* var. *glabriusculum* AM y GA permite sugerir el efecto de los extractos en el campo de cultivo.

ABSTRACT

One of the main plant protection problems in the production of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Latin America and Mexico is the frosty pod rot, caused by *Moniliophthora roreri*. This phytopathogen causes annual production damage of over 75%. The secondary metabolites of the *Capsicum* genus have antifungal effects, and can therefore be used to control *M. roreri*. The aim of this experiment was to evaluate the *in vitro* effect of methanolic extracts (ME) of three *Capsicum* species on *M. roreri*. The ME extracted from immature *C. chinense*, *C. frutescens* fruits and two morphotypes of *C. annuum* var. *glabriusculum* were tested at two concentrations — 1000 and 2500 mg L⁻¹ and evaluated for the inhibition of mycelial growth, sporulation and the viability of conidia produced by *M. roreri*. Both doses (treatments) were established under a complete randomized experimental design with five replicates; each Petri dish was one experimental unit. Data were analyzed with an ANOVA and the means were compared using Tukey's test ($p \leq 0.05$). *Moniliophthora roreri* was sensitive to the ME of the three species. The ME of *C. annuum* var. *glabriusculum*, in their amashito (AM) and garbanzo (GA) morphotypes at 2500 mg L⁻¹ inhibited mycelial growth by up to 95%. The EM of *C. annuum* var. *glabriusculum* AM and GA at 2500 mg L⁻¹ completely inhibited the production of conidia in both concentrations. The EM of *C. chinense* and *C. annuum* var. *glabriusculum* GA inhibited the viability of *M. roreri* conidia by up to 35%. The *in vitro* sensitivity of *M. roreri* to the EM of *C. annuum* var. *glabriusculum* AM and GA helps suggest the effect of the extracts on the field.

Key words: secondary metabolites, cacao frosty pod rot, *Theobroma cacao*, *Moniliophthora roreri*, methanolic extracts, *C. annuum* var. *glabriusculum*.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: octubre, 2019. Aprobado: enero, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 813-824. 2020.

Palabras clave: metabolitos secundarios, moniliasis del cacao, *Theobroma cacao*, *Moniliophthora roreri*, extractos metanólicos, *C. annuum* var. *glabriusculum*.

INTRODUCCIÓN

La moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.) es una enfermedad fúngica ocasionada por *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.) (Evans *et al.*, 1981) la cual ha provocado pérdidas significativas en las áreas productoras de cacao en Latinoamérica. El primer reporte de esta enfermedad fue en el noreste de Colombia, y después se diseminó progresivamente a 14 países de Centro y Sudamérica. En México, la moniliasis se reportó en el 2005 (Phillips-Mora *et al.*, 2006). Ahora se considera la mayor amenaza a la producción de cacao en México, ya que las pérdidas superan el 75% y pone en riesgo la sustentabilidad de este cultivo (Torres-De la Cruz *et al.*, 2011).

Moniliophthora roreri es un patógeno hemibiotrófico que afecta a los frutos de cacao en cualquier etapa de desarrollo. En su fase biotrófica, el patógeno crece intercelularmente y puede alterar el desarrollo de las semillas e inducir deformaciones del fruto (tumefacción). En su fase necrotrofica induce necrosis del endo y mesocarpio; después provoca necrosis en el pericarpio con la manifestación de manchas aceitosas y manchas “chocolate” en la superficie externa del fruto. La necrosis puede cubrir todo el fruto, seguida por la formación de un pseudoestroma blanco y la esporulación (Evans *et al.*, 1981). Los frutos necrosados y esporulados permanecen adheridos al árbol y proveen inóculo secundario o bien inóculo primario para el siguiente ciclo de cultivo (Torres-De la Cruz *et al.*, 2011).

Entre los métodos de control para disminuir esta enfermedad, el manejo cultural es el más utilizado, con acciones que incluyen la remoción semanal de frutos enfermos, mantenimiento del drenaje, control de arvenses, poda y reducción de la altura de los árboles de cacao, saneamiento de frutos eliminados y residuos de cosecha (Ortiz-García *et al.*, 2015). Otro método de control es el químico pero el uso de fungicidas con efectividad contra la moniliasis (Bateman *et al.*, 2005; Torres-De la Cruz *et al.*, 2013), se usa poco debido a los costos. Para el método con control genético Phillips-Mora *et al.* (2012) reportan a los clones CATIE-R4 y CATIE-R6 como resistentes a moniliasis, pero el comportamiento agronómico está en validación en varios países latinoamericanos.

INTRODUCTION

The frosty pod rot of cacao (*Theobroma cacao* L.) is a fungal disease caused by *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.) (Evans *et al.*, 1981), which has led to significant losses in the cacao-producing areas of Latin America. The first report of this disease was in northeastern Colombia, and it slowly spread to 14 countries in Central and South America. In Mexico, frosty pod rot was reported in 2005 (Phillips-Mora *et al.*, 2006). It is now considered the largest threat to cacao production in Mexico, since losses surpassed 75% and jeopardize the sustainability of this crop (Torres-De la Cruz *et al.*, 2011).

Moniliophthora roreri is a hemibiotrophic pathogen that affects cacao fruits in any stage of growth. In its biotrophic phase, the pathogen grows intracellularly and can alter the development of seeds and lead to deformities in the fruit (swelling). In its necrotrophic phase, it induces necrosis of the endocarp and mesocarp, then necrosis in the pericarp with oily spots and “cocoa” spots on the outer surface of the fruit. The necrosis may cover the entire fruit, followed by the formation of a white pseudoestroma and sporulation (Evans *et al.*, 1981). Necrotic and sporulated fruits remain stuck to the trees and provide secondary inoculant or primary inoculant for the next cycle (Torres-De la Cruz *et al.*, 2011).

Among the control methods for this disease, cultural management is the most commonly used, with actions that include the weekly removal of diseased fruits, drainage maintenance, weed control, trimming and reduction of the height of cacao trees, and sanitation of eliminated fruits and harvest residues (Ortiz-García *et al.*, 2015). Another control method is chemical, although the use of effective fungicides against frosty pod rot (Bateman *et al.*, 2005; Torres-De la Cruz *et al.*, 2013) is scarcely used due to high costs. For the method by genetic control, Phillips-Mora *et al.* (2012) report the clones CATIE-R4 and CATIE-R6 as resistant to frosty pod rot (moniliasis), but the agronomic behavior is under validation in several Latin American countries.

In the search for sustainable methods to control frosty pod rot, fungi with antagonistic potential for biological control have been evaluated (Villamil *et al.*, 2015; Reyes-Figueroa *et al.*, 2016). Also, the use of plant extracts has been proposed for the control of *M. roreri* (Ramírez *et al.*, 2011; De la Cruz-Ricardez *et al.*, 2016). Additionally, fruits of the *Capsicum*

En la búsqueda de métodos sustentables para el control de la moniliasis, se han evaluado hongos con potencial antagonista para el control biológico (Villamil *et al.*, 2015; Reyes-Figueroa *et al.*, 2016). Además, se ha propuesto el uso de extractos vegetales para el control de *M. roreri* (Ramírez *et al.*, 2011; De la Cruz-Ricardez *et al.*, 2016). También se ha demostrado que frutos del género *Capsicum* poseen algunos metabolitos secundarios con potencial antifúngico (Rodríguez-Maturino *et al.*, 2015; Bacon *et al.*, 2017; Martinelli *et al.*, 2017). Sin embargo, la efectividad de EM de frutos del género *Capsicum*, sobre *M. roreri*, no se ha evaluado. Así la hipótesis de este estudio es que al menos un EM muestre efectos deletéreos sobre el patógeno. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar *in vitro*, el efecto del EM de frutos de tres especies de *Capsicum* sobre *M. roreri*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de *Moniliophthora roreri*

El aislamiento de *M. roreri* (CPMR1701) fue proporcionado por el Laboratorio de Fitopatología del Colegio de Postgraduados-Campus Tabasco, previamente aislado de frutos de cacao en estado inicial de necrosis externa, de un huerto familiar con manejo cultural del estado de Tabasco, e identificado por morfología y secuencia ITS (número de acceso GenBank: GU108605). La cepa se preservó en completa oscuridad, como cultivo monospórico en medio de cultivo V8 sólido.

Colecta de material vegetal

Las muestras fueron de frutos inmaduros (color verde) de tres especies de *Capsicum*: *C. chinense* Jacq, *C. frutescens* L. y *C. annuum* var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser & Pickersgill morfotipos amashito (AM) y garbanzo (GA). Los morfotipos AM y GA se corroboraron con ejemplares depositados en el herbario CSAT por Prado-Urbina *et al.* (2015) y clasificados como *C. annuum* var. *glabriusculum* por Velázquez-Ventura *et al.* (2018). Los frutos de los dos morfotipos de *C. annuum* var. *glabriusculum* y de *C. frutescens* se recolectaron por la mañana, el 07 de mayo de 2017 en poblaciones silvestres del Ejido Rafael Martínez de Escobar, Huimanguillo, Tabasco, México (17° 43' 18.2" N, 93° 23' 10.7" O); los frutos de *C. chinense* se obtuvieron de un cultivo comercial. Cien frutos de los dos morfotipos de *C. annuum* var. *glabriusculum* y de *C. frutescens* y 25 de *C. chinense*, se secaron al sol por 36 h. Después, se trituraron en un molino para granos de café (KRUPS®, GX410011, Alemania) hasta obtener un polvo fino, el

genus have also been proven to contain secondary metabolites with antifungal properties (Rodríguez-Maturino *et al.*, 2015; Bacon *et al.*, 2017; Martinelli *et al.*, 2017). However, the effectiveness of ME of *Capsicum* fruits on *M. roreri* has not been evaluated. Thus, the hypothesis of this study is that at least one ME shows deleterious effects on the pathogen. Therefore, the aim of this research was to evaluate *in vitro* the effect of the ME from three *Capsicum* species on *M. roreri*.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of *Moniliophthora roreri*

The isolation for *M. roreri* (CPMR1701) was provided by the Plant Pathology Laboratory of the Colegio de Postgraduados-Campus Tabasco and was previously isolated from cacao fruits in an initial state of external necrosis taken from a domestic orchard with cultural management in the state of Tabasco and identified by morphology and ITS sequence (GenBank access number: GU108605). The strain was preserved in complete darkness as a monosporic culture in a solid V8 culture medium.

Plant material collection

The samples were from immature fruits (green color) of three species of *Capsicum*: *C. chinense* Jacq, *C. frutescens* L. and *C. annuum* var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser & Pickersgill, of the amashito (AM) and garbanzo (GA) morphotypes. AM and GA morphotypes were corroborated with samples deposited in the CSAT herbarium by Prado-Urbina *et al.* (2015) and classified as *C. annuum* var. *glabriusculum* by Velázquez-Ventura *et al.* (2018). The fruits of both *C. annuum* var. *glabriusculum* and *C. frutescens* morphotypes were collected in the morning of May 7, 2017 from wild populations of the Ejido Rafael Martínez de Escobar, Huimanguillo, Tabasco, Mexico (17° 43' 18.2" N, 93° 23' 10.7" O); the *C. chinense* fruits were taken from a commercial plantation.

One hundred fruits of both *C. annuum* var. *glabriusculum* and *C. frutescens* morphotypes and 25 *C. chinense* fruits were sun-dried for 36 h. They were then ground in a coffee seeds mill (KRUPS®, GX410011, Germany) until a fine powder was obtained, which was packed into plastic containers with lids and refrigerated at 5 °C until use.

Determination of methanolic extracts

Two grams of each species were added 20 mL of 80% methanol, placed in a double boiler at 50 °C for 30 min

cual se empacó en recipientes de plástico con tapa y almacenado en refrigeración a 5 °C hasta su uso.

Determinación de los extractos metanólicos

A 2 g de cada especie se agregaron 20 mL de metanol al 80%, se colocaron en baño María a 50 °C por 30 min y se centrifugaron a 10173 x g durante 15 min en una centrífuga marca Hermle Z 383 modelo 2383 (Alemania). El sobrenadante (EM) se recuperó y se guardó en oscuridad a 5 °C hasta su uso.

Los EM se cuantificaron mediante la concentración de polifenoles totales (PFT) de acuerdo con Singleton *et al.* (1999); se tomaron 0.2 mL del extracto obtenido y se adicionaron 1.5 mL de agua destilada, 0.1 mL del reactivo Folin-Denis al 50% y 0.2 mL de carbonato de sodio anhidro al 15%. Los contenidos se mezclaron en vórtex y se incubaron 30 min en la oscuridad. Para la curva de calibración se preparó una solución stock de 100 µg mL⁻¹ de ácido gálico (Sigma-Aldrich®). A partir de la solución stock, se realizaron soluciones estándar de 0 a 100 µg mL⁻¹. Las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 765 nm en un espectrómetro UV-VIS (Multiskan Go 51119300; Thermo Fisher Scientific, Finlandia). La cuantificación de PFT se realizó por triplicado en diferentes concentraciones (Cuadro 1).

Bioensayo de actividad antifúngica *in vitro*

El potencial antifúngico de los EM se determinó por la evaluación del crecimiento micelial (CM), la esporulación (ES) y la viabilidad de los conidios (VC) producidos de *M. roseri* CPMR1701. Los EM se prepararon a concentraciones de 1000 y 2500 mg L⁻¹ de PFT. Para ello, se calculó el volumen de EM necesario para obtener cada concentración y se depositó en matraces Erlenmeyer de 25 mL que se colocaron a 70 °C hasta la completa evaporación del solvente (4 h). El residuo se homogenizó con 5 mL de agua destilada estéril. Este extracto libre de metanol (ESM) se agregó al medio de cultivo V8 clarificado antes de vaciar a las cajas de Petri, utilizando jeringas con filtros de 0.20 µm (Corning®, Alemania) para mantener la asepsia del

and centrifuged at 10173 x g for 15 min in a Hermle Z 383 model 2383 centrifuge (Germany). The supernatant (ME) was recovered and stored in the dark at 5 °C until use.

The MEs were quantified with the concentration of total polyphenols (TPP), following Singleton *et al.* (1999); 0.2 mL were taken from the resulting extract and 1.5 mL of distilled water were added, along with 0.1 mL of the Folin-Denis reagent at 50% and 0.2 mL of anhydrous sodium carbonate 15%. The contents were mixed in a vortex and incubated for 30 min in the dark. For the calibration curve, a stock solution of 100 µg mL⁻¹ of gallic acid (Sigma-Aldrich®) was prepared. From the stock solution, standard solutions of 0 to 100 µg mL⁻¹ were prepared. The absorbance readings were carried out at a wavelength of 765 nm in a UV-VIS (Multiskan Go 51119300; Thermo Fisher Scientific, Finland) spectrometer. The quantification of TPP was carried out in triplicate in different concentrations (Table 1).

Bioassay of antifungal activity *in vitro*

The antifungal potential of the MEs was determined by the evaluation of the mycelial growth (MG), the sporulation (ES) and the viability of the conidia (VC) produced by *M. roseri* CPMR1701. The MEs were prepared at concentrations of 1000 and 2500 mg L⁻¹ of TPP. In order to do this, the volume of MEs required to obtain each concentration was calculated and deposited in 25 mL Erlenmeyer flasks which were placed under 70 °C temperatures until the solvent evaporated completely (4 h). The residue was homogenized with 5 mL of sterile distilled water. This methanol-free extract (MFE) was added to the clarified V8 culture medium before pouring into the Petri dishes, using syringes with 0.20 µm filters (Corning®, Germany) to maintain the asepsis of the medium. For the control (without ME), 5 mL of sterile distilled water were added to the clarified V8 culture medium before pouring into the Petri dishes, using the same filters. Then, 5 mL of culture medium with MFE were transferred to 60 mm Petri dishes with a self-filling syringe (Socorex® 173, Switzerland). *Moniliophthora roseri* CPMR1701 was inoculated with a mycelium disc, approximately 5 mm in diameter, in the

Cuadro 1. Concentración de polifenoles totales (PFT) en frutos inmaduros de tres especies de *Capsicum*.
Table 1. Concentration of total polyphenols (TPP) in immature fruits of three *Capsicum* species.

Especie	PFT (mg g ⁻¹) [†]
<i>C. chinense</i>	13.50
<i>C. frutescens</i>	12.32
<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i> morfotipo AM	9.62
<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i> morfotipo GA	6.65

[†] PFT: polifenoles totales en peso seco. ❖ TPP: total polyphenols in dry weight.

medio. Para el testigo (sin EM) se agregaron 5 mL de agua destilada estéril al medio de cultivo V8 clarificado antes de vaciar a las cajas de Petri, utilizando los mismos filtros. Después, 5 mL de medio de cultivo con ESM se transfirieron a cajas de Petri de 60 mm mediante una jeringa de autollenado (Socorex® 173, Suiza). *Moniliophthora roreri* CPMR1701 se inoculó con disco de micelio de aproximadamente 5 mm de diámetro en el centro de cada caja de Petri con medio V8 clarificado + ESM, el cual se incubó a 25 °C en oscuridad completa.

VARIABLES EVALUADAS

Crecimiento micelial de *M. roreri* CPMR1701

El diámetro del crecimiento micelial (CM) se midió con un vernier manual (Pretul® modelo VER-6P, México) en dos ejes ortogonales. Las mediciones se realizaron cada 24 h y concluyó cuando las colonias del tratamiento testigo llenaron completamente la caja de Petri. El porcentaje de inhibición del CM por tratamiento en relación al testigo se calculó con la siguiente fórmula:

$$E = ((V_t - E_m) / V_t) * 100 \quad (1)$$

donde E: Eficiencia, V_t: valor de la variable en el testigo, E_m: valor de la variable en el tratamiento con los EM.

Esporulación de *M. roreri* CPMR1701

En las cajas de Petri donde se observó el CM, se agregaron 5 mL de agua destilada estéril + Tween 80 (0.1%), para la colección de conidios con espátula de acero inoxidable esteril. El sobrenadante se homogenizó 10 min con agitador magnético (Thermolyne®, Artur H. Thomas Co., EE.UU.), después se filtró con gasas estériles para separar el micelio. La solución se depositó en un tubo con tapa, previamente esterilizado. El conteo de conidios se realizó en cámara de Neubauer (Hausser Scientific, EE.UU.). La concentración de conidios·mL⁻¹ se estimó mediante la fórmula (Lipa y Slizynski, 1973):

$$C = (C_c) (4 \times 10^6) (F_d 80^{-1}) \quad (2)$$

donde C: número de conidios mL⁻¹, C_c: número promedio de conidios contados en la cámara de Neubauer y F_d: factor de dilución

Viabilidad de conidios de *M. roreri* CPMR1701

Para la VC se obtuvo una suspensión de 5x10⁶ conidios mL⁻¹, de la cual se depositaron 30 μL en cuatro zonas de la caja de Petri

center of each Petri dish with clarified V8 medium + MFE, which was incubated at 25 °C in complete darkness.

Measured variables

Mycelial growth of *M. roreri* CPMR1701

The diameter of the mycelial growth (MG) was measured using a manual caliper (Pretul® model VER-6P, Mexico) in two orthogonal axes. Measurements were taken every 24 h and we concluded when the control treatment cultures filled the Petri dish completely. The percentage of inhibition of the MG per treatment in relation to the control was calculated using the following formula:

$$E = ((V_t - E_m) / V_t) * 100 \quad (1)$$

where E: Efficiency, V_t: value of the variable in the control, E_m: value of the variable in the treatment with the MEs.

Sporulation of *M. roreri* CPMR1701

In the Petri dishes in which the MG was observed, 5 mL were added of sterile distilled water + Tween 80 (0.1%) to collect conidia with a sterilized stainless-steel spatula. The supernatant was homogenized for 10 min with a magnetic stirrer (Thermolyne®, Artur H. Thomas Co., EE.UU.) and was then filtered with sterile gauzes to separate the mycelium. The solution was placed in a previously sterilized tube with a lid. The conidia count was carried out in a Neubauer chamber (Hausser Scientific, U.S.A.). The concentration of conidia mL⁻¹ was estimated using the following formula (Lipa and Slizynski, 1973):

$$C = (C_c) (4 \times 10^6) (F_d 80^{-1}) \quad (2)$$

where C: number of conidia mL⁻¹, C_c: average number of conidia counted in the Neubauer chamber, and F_d: dilution factor.

Viability of *M. roreri* CPMR1701 conidia

For the VC, we obtained a suspension of 5x10⁶ conidia mL⁻¹, out of which 30 μL were deposited in four areas of the Petri dish with clarified V8 medium. The aliquot of conidia was covered with sterile slide cover and the dishes with V8 + inoculant were incubated at 25±0.5 °C in the dark. Observations and registers were performed every 24 h until the control strains displayed a germination of 90% (120 h). The conidia were considered germinated when the germinative tube reached the length of half a conidium (4-6 μm). The percentage of germination was obtained by observing 100 conidia per treatment and replicate.

con medio V8 clarificado. La alícuota de conidios se cubrió con cubreobjetos estériles y las cajas con medio V8 + inóculo se incubaron a 25 ± 0.5 °C en oscuridad. Las observaciones y el registro se efectuaron cada 24 h hasta que en las cepas testigo se cuantificó el 90% de germinación (120 h). Los conidios se consideraron germinados cuando el tubo germinativo alcanzó la longitud de la mitad del conidio ($4-6 \mu\text{m}$). El porcentaje de germinación se obtuvo de la observación de 100 conidios por tratamiento y repetición.

La efectividad de los EM sobre el CM, Esporulación (ES) y VC se calculó con la fórmula de Abbott (1925):

$$E = ((V_t - E_m) / V_t) * 100 \quad (3)$$

donde E: Eficiencia, V_t : valor de la variable en el testigo, E_m : valor de la variable en el tratamiento con los EM.

Diseño experimental

Los resultados de cada bioensayo se analizaron estadísticamente con un diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo factorial; considerando como tratamientos (ocho) a las combinaciones de los factores: materiales vegetales (*C. chinense*, *C. frutescens*, *C. annuum* var. *glabriusculum*-morfortipos AM y *C. annuum* var. *glabriusculum*-morfortipos GA) y concentraciones (1000 y 2500 mg L^{-1}). Además, de la inclusión de un testigo positivo (0.0 mg L^{-1} EM) con cinco repeticiones por tratamiento. La unidad experimental fue una caja de Petri. Los datos en porcentajes de CM, ES y VC se transformaron con la función al coseno de la raíz cuadrada del valor porcentual. El análisis de varianza (ANDEVA) se realizó con el software InfoStat versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017) a un nivel de error con $p \leq 0.05$. Los promedios de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento micelial de *M. roreri* CPMR1701

El crecimiento de las colonias correspondiente a tratamientos, respecto al testigo, se desarrolló con forma, tamaño y textura normal, de color crema, con centro de color café claro a salmón; las colonias mostraron la esporulación tal como la describen Evans *et al.* (1981) en cultivo *in vitro*. Asimismo, se observaron crecimientos diferenciados por efecto de los tratamientos. Con los EM de los dos morfortipos de *C. annuum* var. *glabriusculum* en concentración de 2500 mg L^{-1} , la colonia de *M. roreri* solo creció

The effectiveness of the MEs on the MG, sporulation (ES) and VC were reached using Abbott's formula (1925):

$$E = ((V_t - E_m) / V_t) * 100 \quad (3)$$

where E: Efficiency, V_t : value of the variable in the control, E_m : value of the variable in the treatment with the ME.

Experimental design

The results of each bioassay were analyzed statistically with a completely randomized experimental design (DCA) with a factorial arrangement; considering as treatments (eight), the combinations of the following factors: plant materials (*C. chinense*, *C. frutescens*, *C. annuum* var. *glabriusculum*-morfortipos AM and *C. annuum* var. *glabriusculum*-morfortipos GA) and concentrations (1000 and 2500 mg L^{-1}), as well as the inclusion of a positive control (0.0 mg L^{-1} ME) with five replicates per treatment. The experimental unit was one Petri dish. The data, in percentages, of MG, ES and VC were transformed with the function to the arcsine of the square root of the percentage value. The analysis of variance (ANOVA) was performed using the software InfoStat version 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017) at a probability error of $p \leq 0.05$. Treatment means were compared using the Tukey's test.

RESULTS AND DISCUSSION

Mycelial growth of *M. roreri* CPMR1701

The growth of cultures corresponding to treatments, regarding the control, occurred in normal shape, size and texture; cream colored, with a light brown to salmon-colored center; the cultures displayed sporulation just as described by Evans *et al.* (1981) for *in vitro* culture. Likewise, different growths were observed due to the effect of the treatments. With the MEs of both *C. annuum* var. *glabriusculum* morphotypes in a concentration of 2500 mg L^{-1} , the *M. roreri* culture only grew around the inoculated mycelium disc, with dense mycelia and a lighter appearance. In addition, at both concentrations of the *C. chinense* and *C. frutescens* ME, cultures presented different mycelium textures in comparison with the control (Figure 1).

Regarding the efficiency results (%) of the *Capsicum* spp. MEs on the MG of the studied strain, ANOVA showed that the *Capsicum* MEs have an antifungal potential *in vitro* against *M.*

alrededor del disco del micelio inoculado, con micelio denso y una apariencia más clara. Además, en ambas concentraciones del EM de *C. chinense* y *C. frutescens*, se muestran en las colonias texturas de micelio diferentes con respecto al testigo (Figura 1).

roveri CPMR1701 (Figure 2). The effectiveness over MG showed significant difference ($p \leq 0.05$). The treatments with greater effectiveness over the MG were the *C. annuum* var. *glabriusculum* MEs morphotype AM-2500 mg L⁻¹ (97.69%) and *C.*

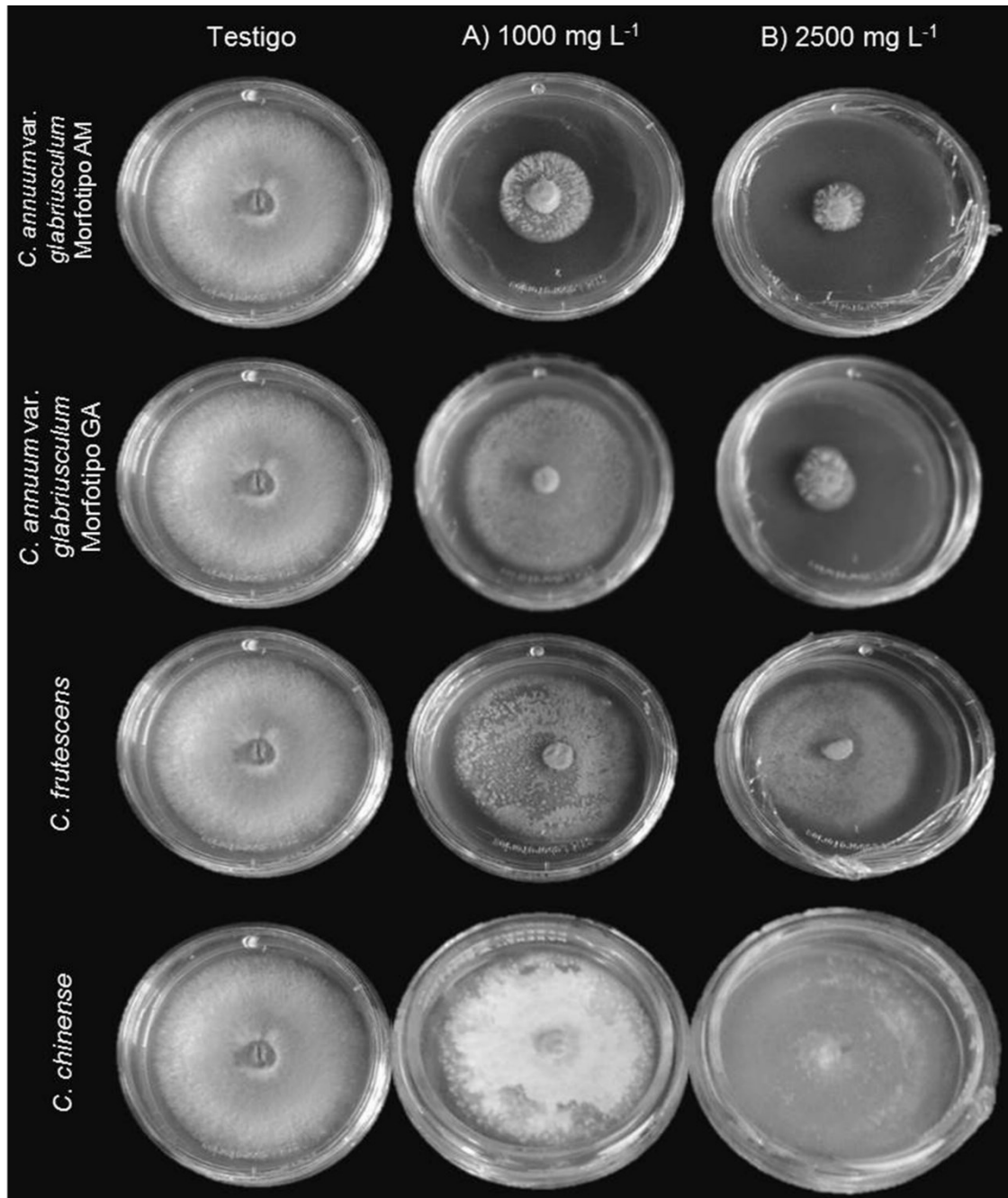


Figura 1. Efecto de dos concentraciones (A-B) de extractos metanólicos de tres especies de *Capsicum* sobre el crecimiento micelial de *Moniliophthora roveri*.

Figure 1. Effect of two concentrations (A-B) of methanolic extracts from three *Capsicum* species on the mycelial growth of *Moniliophthora roveri*.

Respecto a los resultados de eficiencia (%) de los EM de *Capsicum* spp. en el CM de la cepa estudiada, el ANDEVA mostró que los EM de *Capsicum*, tienen potencial antifúngico *in vitro* contra *M. royeri* CPMR1701 (Figura 2). La efectividad sobre el CM mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Los tratamientos con la mayor efectividad sobre el CM fueron los EM de *C. annuum* var. *glabriusculum* morfotipo AM-2500 mg L⁻¹ (97.69%) y *C. annuum* var. *glabriusculum* morfotipo GA-2500 mg L⁻¹ (96.21%). Mientras *C. annuum* var. *glabriusculum* morfotipo AM a 1000 mg L⁻¹ mantuvo una eficiencia mayor al 85%. Sin embargo, los EM de *C. chinense* a 2500 mg L⁻¹ (22.11%) y 1000 mg L⁻¹ (21.84%) presentaron eficiencia menor sobre el CM.

En nuestro estudio el efecto de *C. annuum* var. *glabriusculum* sobre el CM de *M. royeri* fue mayor a lo registrado por Rodríguez-Maturino *et al.* (2015), quienes observaron eficiencia de inhibición de 38.46% sobre el CM de *Alternaria alternata*, pero la concentración del extracto utilizado fue 100 mg mL⁻¹. Bacon *et al.* (2017) encontraron porcentajes de inhibición superiores respecto al testigo con extractos de *C. annuum* var. *annuum* sobre el crecimiento de las

annuum var. *glabriusculum*, morfotipo GA-2500 mg L⁻¹ (96.21%). Whereas *C. annuum* var. *glabriusculum*, morfotipo AM at 1000 mg L⁻¹ maintained an efficiency of above 85%. However, the *C. chinense* MEs at 2500 mg L⁻¹ (22.11%) and 1000 mg L⁻¹ (21.84%) presented a lower efficiency on the MG.

In our study, the effect of *C. annuum* var. *glabriusculum* on the MG of *M. royeri* was higher than registered by Rodríguez-Maturino *et al.* (2015), who observed an inhibition efficiency of 38.46% on the MG of *Alternaria alternata*, but the concentration of the extract used was 100 mg mL⁻¹. Bacon *et al.* (2017) found higher percentages of inhibition than the control with *C. annuum* var. *annuum* extracts on the growth of pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. The lower effect of the ME of *C. chinense* was observed on *Aspergillus niger* and *Candida albicans* (Martinelli *et al.*, 2017). Also, the ME of *C. frutescens* seeds showed no effectiveness on *A. flavus*, but they did show effectiveness on *C. albicans*, *C. krusei*, *A. niger* and *A. alternata*, indicating that the effect varies with the *Capsicum* species used and the species of the pathogen under study

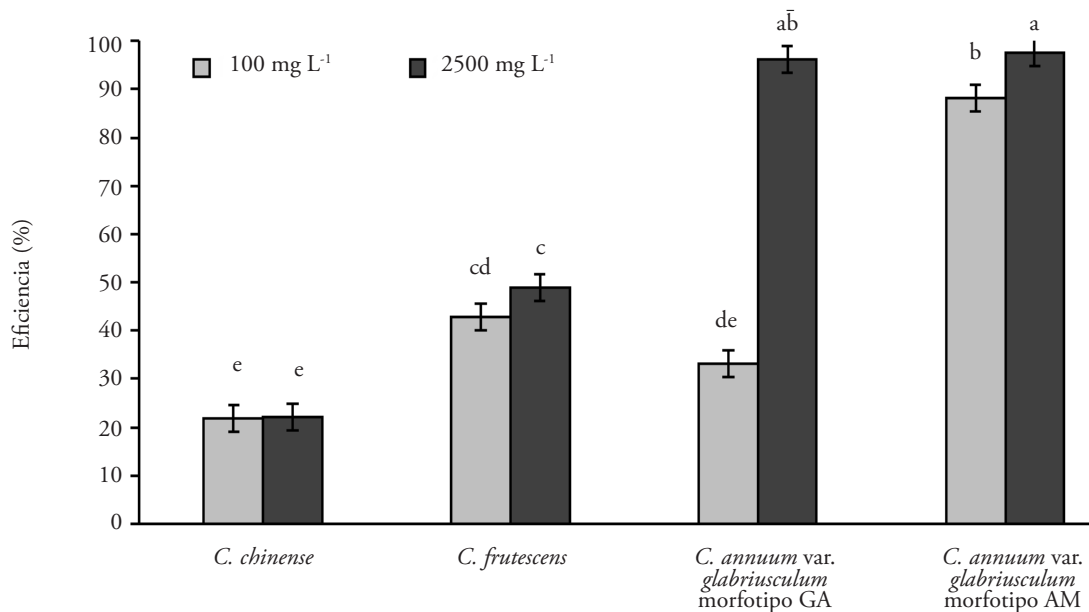


Figura 2. Efectividad *in vitro* de extractos metanólicos de tres especies de *Capsicum* sobre el crecimiento micelial de *M. royeri* CPMR1701 a 1000 y 2500 mg L⁻¹. Barras con letra diferente presentan diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 2. Effectiveness of *in vitro* extraction of methanolic acids from three *Capsicum* species on the mycelial growth of *M. royeri* CPMR1701 at 1000 and 2500 mg L⁻¹. Bars with different letters show statistical difference (Tukey, $p \leq 0.05$).

bacterias patógenas *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica*. El efecto menor del EM de *C. chinense* se observó sobre *Aspergillus niger* y *Candida albicans* (Martinelli *et al.*, 2017). Además, EM de semillas de *C. frutescens* no mostraron efectividad sobre *A. flavus*, pero mostraron efectividad sobre *C. albicans*, *C. krusei*, *A. niger* y *A. alternata*, lo cual indica que el efecto varía de acuerdo con la especie de *Capsicum* empleada y la especie del patógeno en estudio (Gurnani *et al.*, 2016). Tamayo-España *et al.* (2016) indicaron que extractos de material fresco y seco de *Origanum vulgare*, *Tradescantia spathacea* y *Zingiber officinale* en concentraciones de 50 y 40% (V/V) inhibían por completo el CM de *M. roreri*. Los EM de *C. annuum* var. *glabriusculum* se suman a las especies con potencial para el control de *M. roreri*.

Esporulación de *M. roreri* CPMR1701

Diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) existieron en la efectividad de los EM de las especies diferentes de *Capsicum* sobre la ES de *M. roreri* CPMR1701 (Figura 3). Los EM con efectividad inhibitoria al 100% sobre la ES de *M. roreri* CPMR1701 fueron las dos concentraciones de *C. annuum* var. *glabriusculum* morfotipo AM y la concentración de 2500 mg L⁻¹ del morfotipo GA.

(Gurnani *et al.*, 2016). Tamayo-España *et al.* (2016) indicated that extracts of fresh and dry *Origanum vulgare*, *Tradescantia spathacea* and *Zingiber officinale* material in concentrations of 50 and 40% (V/V) completely inhibited the MG of *M. roreri*. The MEs of *C. annuum* var. *glabriusculum* were added to the species with a potential for the control of *M. roreri*.

Sporulation of *M. roreri* CPMR1701

Statistical difference ($p \leq 0.05$) existed in the effectiveness of the MEs of the different *Capsicum* species on the ES of *M. roreri* CPMR1701 (Figure 3). The MEs with an inhibiting effect of 100% on the ES of *M. roreri* CPMR1701 were the two concentrations of *C. annuum* var. *glabriusculum*, morphotype AM and the concentration of 2500 mg L⁻¹ of the morphotype GA.

The least effective treatment was *C. chinense*-1000 mg L⁻¹, with 7.59%. The reviewed literature shows no evidence of the effect of *Capsicum* spp. ME on the production of conidia of phytopathogenic fungi. Nevertheless, there are studies on the effect of extracts of other plant species on the ES of *M. roreri*. In that regard, Tamayo-España *et al.* (2016) found that *O. vulgare*, *T. spathacea* and *Z. officinale* extracts in concentrations of 50 and 40% (V/V)

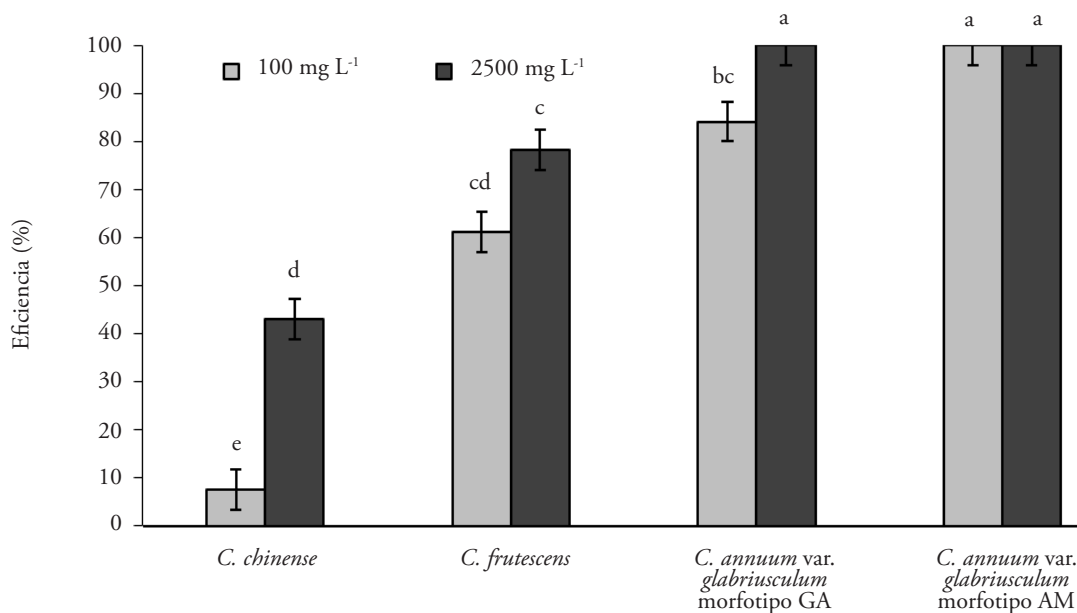


Figura 3. Efectividad *in vitro* de extractos metanólicos de tres especies de *Capsicum* sobre la esporulación de *M. roreri* a 1000 y 2500 mg L⁻¹. Barras con letra diferente presentan diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 3. *In vitro* effectiveness of methanolic extracts from three *Capsicum* species on the sporulation of *M. roreri* at 1000 and 2500 mg L⁻¹. Bars with different letters show statistical difference (Tukey, $p \leq 0.05$).

El tratamiento con efectividad menor fue *C. chinense*-1000 mg L⁻¹, con 7.59%. En la literatura revisada no hay evidencia sobre el efecto de EM de *Capsicum* spp. en la producción de conidios de hongos fitopatógenos. Pero existen estudios del efecto de extractos de otras especies vegetales sobre la ES de *M. royeri*. Al respecto, Tamayo-España *et al.* (2016) encontraron que extractos de *O. vulgare*, *T. spathacea* y *Z. officinale* en concentraciones de 50 y 40% (V/V) inhibieron por completo (100%) la formación de conidios de *M. royeri*. Además, De la Cruz-Ricardez *et al.* (2016) informaron que el extracto alcaloideo de semillas de *Lupinus montanus*, en concentración de 10 mg mL⁻¹, inhibe en 83.6% la esporulación de *M. royeri* CPMR1701.

Viabilidad de conidios de *M. royeri* CPMR1701

Las diferencias en la efectividad de los EM, de las especies de *Capsicum*, sobre la VC de *M. royeri* CPMR1701 fueron significativas ($p \leq 0.05$) (Figura 4). El tratamiento que indujo la mayor pérdida de viabilidad fue el EM de *C. annuum* var. *glabriusculum* morfotipo GA-1000 mg L⁻¹ (35.8%), sin diferencias significativas con *C. chinense* a 2500 mg L⁻¹ y 1000 mg L⁻¹.

completely inhibited (100%) the formation of *M. royeri* conidia. Additionally, De la Cruz-Ricardez *et al.* (2016) reported that the alkaloid extract of *Lupinus montanus* seeds, in concentrations of 10 mg mL⁻¹, inhibits by 83.6% the sporulation of *M. royeri* CPMR1701.

Viability of *M. royeri* CPMR1701 conidia

The difference in the effectiveness of MEs of the *Capsicum* species on the VC of *M. royeri* CPMR1701 were significant ($p \leq 0.05$) (Figure 4). The treatment that led to the greatest loss in viability was the *C. annuum* var. *glabriusculum* ME, morphotype GA-1000 mg L⁻¹ (35.8%); no significant difference with *C. chinense* at 2500 mg L⁻¹ and 1000 mg L⁻¹.

Treatments with the lowest effect on the VC were *C. frutescens*-1000 mg L⁻¹ and *C. frutescens*-2500 mg L⁻¹, with an effectiveness below 10%. The treatments with the two morphotypes of *C. annuum* var. *glabriusculum* were not included in VC evaluation because they completely inhibited (100%) the ES in the bioassay. We did not evaluate the direct effect of the MEs on germination, although its effect on VC was evident. The effect of *C. chinense* and *C. annuum* var. *glabriusculum* GA on the VC of *M. royeri* CPMR1701 is documented here for the first time.

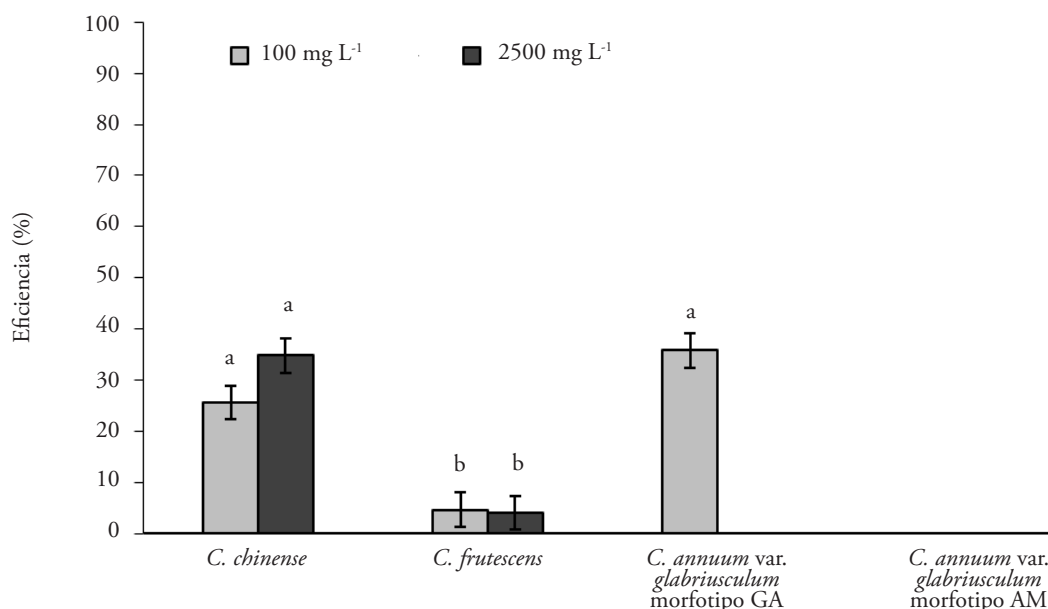


Figura 4. Efecto *in vitro* de extractos metanólicos de tres especies de *Capsicum* a 1000 y 2500 mg L⁻¹, sobre la viabilidad de conidios de *M. royeri*. Barras con letra diferente presentan diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 4. *In vitro* effect of methanolic extracts from three *Capsicum* species at 1000 and 2500 mg L⁻¹, on the viability of *M. royeri* conidia. Bars with different letters show statistical difference (Tukey, $p \leq 0.05$).

Los tratamientos con efecto menor sobre la VC fueron *C. frutescens*-1000 mg L⁻¹ y *C. frutescens*-2500 mg L⁻¹, con efectividad menor al 10%. Los tratamientos con los dos morfotipos de *C. annuum* var. *glabriusculum*, no se incluyeron en esta evaluación porque en el bioensayo, estos inhibieron por completo (100%) la ES. En este estudio no se evaluó el efecto directo de los EM sobre la germinación, pero su efecto sobre la VC fue evidente. El efecto de *C. chinense* y *C. annuum* var. *glabriusculum* GA sobre la VC de *M. roreri* CPMR1701 se documenta aquí por primera vez.

Ngai y Ng (2007) encontraron efectividad de extractos de *C. frutescens* var. *fasciculatum* sobre la germinación de conidios de *F. moniliforme* y *A. flavus*, pero no mostraron efectividad sobre esta variable en *F. graminearum*, *F. solani*, *Physalospora piricola* y *Botrytis cinerea*. Además, extractos fenólicos de *C. annuum* var. *glabriusculum* redujeron la germinación de conidios de *A. alternata* al 92% y de *F. oxysporum* al 85% (Rodríguez-Maturino *et al.*, 2015). En nuestra investigación, el efecto de los EM de *C. annuum* var. *glabriusculum* fue muy fuerte al inhibir completamente la producción de conidios, lo cual impidió medir su efecto sobre la VC.

La variación de la eficiencia de los EM de las especies de *Capsicum* sobre el CM, ES y VC de *M. roreri* CPMR1701 se puede deber a diferencias entre el perfil fitoquímico de los EM de cada especie. Al respecto, Bacon *et al.* (2017) indicaron que el efecto de los extractos de *Capsicum* sobre los microorganismos no es exclusivo de un componente en particular, sino del conjunto de componentes presentes en el extracto.

CONCLUSIONES

Los extractos metanólicos de *C. frutescens*, *C. chinense* y de ambos morfotipos de *C. annuum* var. *glabriusculum* mostraron efectividad diferente en el crecimiento micelial, la esporulación y la viabilidad de conidios de *M. roreri* CPMR1701, según las concentraciones de extractos metanólicos utilizadas.

El extracto de *C. annuum* var. *glabriusculum* morfotipo Amashito alcanzó el mayor efecto, al nulificar el crecimiento micelial y la esporulación de *M. roreri* CPMR1701, incluso en su concentración más baja.

Los extractos de *C. chinense* y *C. annuum* var. *glabriusculum* morfotipo Garbanzo permitieron la esporulación de *M. roreri* CPMR1701, pero mostraron

Ngai and Ng (2007) found effectiveness in extracts of *C. frutescens* var. *fasciculatum* on the germination of *F. moniliforme* and *A. flavus* conidia, but they showed no effectiveness on this variable in *F. graminearum*, *F. solani*, *Physalospora piricola* and *Botrytis cinerea*. In addition, phenolic *C. annuum* var. *glabriusculum* extracts reduced the germination of *A. alternata* conidia by 92% and *F. oxysporum* by 85% (Rodríguez-Maturino *et al.*, 2015). In our research, the effect of the *C. annuum* var. *glabriusculum* MEs was very strong, since they completely inhibited the production of conidia, which prevented us from measuring that ME effect on VC.

The variation of the efficiency of the MEs from *Capsicum* species on the MG, ES and VC of *M. roreri* CPMR1701 may be due to differences in the ME phytochemical profile of each species. Regarding that, Bacon *et al.* (2017) indicated that the effect of *Capsicum* extracts on the microorganisms is not exclusive to one particular component, but rather depends on the particular set of components present in the extract.

CONCLUSIONS

The methanolic extracts of *C. frutescens*, *C. chinense* and both morphotypes of *C. annuum* var. *glabriusculum* showed different effectiveness on the mycelial growth, sporulation and viability of *M. roreri* CPMR1701 conidia, depending on the concentrations of methanolic extracts used.

The extract of *C. annuum* var. *glabriusculum*, morphotype Amashito reached the greatest effect, since it nullified mycelial growth and sporulation of *M. roreri* CPMR1701, even in its lowest concentration.

The extracts of *C. chinense* and *C. annuum* var. *glabriusculum*, morphotype Garbanzo allowed the sporulation of *M. roreri* CPMR1701, but showed a negative impact on the viability of conidia. This is the first report on the antifungal effect of methanolic extracts of *Capsicum* spp. on *M. roreri* CPMR1701.

—End of the English version—

-----*-----

un efecto negativo sobre la viabilidad de conidios. Este es el primer reporte del efecto antifúngico de los extractos metanólicos de *Capsicum* spp. sobre *M. royeri* CPMR1701.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de investigación de posgrado No. 612517, otorgada a D. De la Cruz-Ricardez.

LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 256-267.
- Bacon, K. R., Boyer, C., Denbow, S., O'Keefe, A., Neilson, and R. Williams. 2017. Antibacterial activity of jalapeño pepper (*Capsicum annuum* var. *annuum*) extract fractions against select foodborne pathogens. *Food Sci. Nutr.* 5: 730-738.
- Bateman, R. P., E. Hidalgo, J. García, C. Arroyo, M. ten Hoopen, V. Adonijah, and U. Krauss. 2005. Application of chemical and biological agents for the management of frosty pod rot (*Moniliophthora royeri*) in Costa Rican cocoa (*Theobroma cacao*). *Ann Appl Biol.* 147: 129-138.
- De la Cruz-Ricardez, D., L. C. Lagunes-Espinoza, C. F. Ortiz-García, y M. Pablo-Pérez. 2016. Actividad antifúngica *in vitro* del extracto acuoso y alcaloideo de *Lupinus* spp. en *M. royeri*. *Agroproductividad* 9: 3-9.
- Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, y C. W. Robledo. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar> (Consulta: noviembre 2018).
- Evans, H. C. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora* (*Monilia*) *royeri*. *Phytopathol. Papers* 24: 44.
- Gurnani, N., M. Gupta, D. Mehta, and B. K. Mehta. 2016. Chemical composition, total phenolic and flavonoid contents, and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of crude extracts from red chilli seeds (*Capsicum frutescens* L.). *J. Taibah Univ. Sci.* 10: 462-470.
- Lipa, J. J., i K. Slizynsky. 1973. Wskazówki metodyczne I terminologia dowyznaczenia snedniej dawki swiertelnej (LD₅₀) w patologii owadów i toksykologii [Methodological instructions and terminology for determination of average lethal dose (LD₅₀) in insect pathology and toxicology]. *Prace Nauk. Inst. Ochr. Roslin* 15: 59-83.
- Martinelli, L., J. M., Rosa, C. dos S. B. Ferreira, G. M. da L. Nascimento, M. S. Freitas, L. C. Pizato, W. de O. Santos, R. F. Pires, M. H. Okura, G. R. P. Malpass, and A. C. Grana-to. 2017. Antimicrobial activity and chemical constituents of essential oils and oleoresins extracted from eight pepper species. *Cienc. Rural* 47: 1-7.
- Ngai, P. H. K., and T. B. Ng. 2007. A lectin with antifungal and mitogenic activities from red cluster pepper (*Capsicum frutescens*) seeds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 366-370.
- Ortiz-García C. F., M. Torres-De la Cruz, y S. C. Hernández-Mateo. 2015. Comparación de dos sistemas de manejo del cultivo del cacao, en presencia de *Moniliophthora royeri*, en México. *Rev. Fitotec. Mex.* 38:191-196.
- Phillips-Mora, W., A. Arciniegas-Leal, A. Mata-Quiros, and J. C. Motomajor-Arias. 2012. Catálogo de clones de cacao seleccionados por el CATIE para siembras comerciales. Turrialba, Costa Rica: CATIE. 68 p. http://www.worldcocoaoundation.org/wp-content/uploads/files_mf/philippsmora2012clones4.64mb.pdf. (Consulta: diciembre 2018).
- Phillips-Mora, W., A. Coutiño, C. F. Ortiz, A. P. López, J. Hernández, and M. C. Aime. 2006. First report of *Moniliophthora royeri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cacao in Mexico. *Plant Pathol.* 55: 584.
- Prado-Urbina, G., L. C. Lagunes-Espinoza, E. García-López, C. C. Bautista-Muñoz, W. Camacho-Chiu, F. Mirafuentes G, y V. H. Aguilar-Rincón. 2015. Germinación de semillas de chiles silvestres en reapuesta a tratamientos pre-germinativos. *Ecosist. Recur. Agropec.* 2: 139-149.
- Ramírez, G. S., O. López B., T. Guzmán H., S. Munguía U., and S. Espinosa Z. 2011. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora royeri* (Cif & Par) Evans *et al.* *Tecnol. Marcha* 24: 3-17.
- Reyes-Figueroa, O., C. F. Ortiz-García, M. Torres-De la Cruz, M., L. C. Lagunes-Espinoza, and G. Valdovinos-Ponce. 2016. *Trichoderma* species from the cacao agroecosystem with biocontrol potential of *Moniliophthora royeri*. *Rev. Chapingo Ser. Cienc. For. Ambient.* 22: 149-163.
- Rodríguez-Maturino, A., R. Troncoso-Rojas, A. Sánchez-Estrada, D. González-Mendoza, E. Ruiz-Sanchez, R. Zamora-Bustillos, C. Ceceña-Duran, O. Grimaldo-Juarez, y M. Aviles-Marina. 2015. Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. *Rev. Argent. Microbiol.* 47: 72-77.
- Singleton, V. L., R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.* 299: 152-178.
- Tamayo-España, L. E., S. I. Ramírez-González, O. López-Báez, R. R. Quiroga-Madrígal, y S. Espinosa-Zaragoza. 2016. Extractos por destilación de *Origanum vulgare*, *Tradescantia spathacea* y *Zingiber officinale* para el manejo de *Moniliophthora royeri* de *Theobroma cacao*. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* 7: 1065-1076.
- Torres-De la Cruz, M., C. F. Ortiz-García, D. Téliz-Ortiz, A. Mora-Aguilera, and C. Nava-Díaz. 2011. Temporal progress and integrated management of frosty pod rot (*Moniliophthora royeri*) of cocoa in Tabasco, Mexico. *J. Plant Pathol.* 93:31-36.
- Torres-De la Cruz, M., C. F. Ortiz-García, D. Téliz-Ortiz, A. Mora-Aguilera, y C. Nava Díaz. 2013. Efecto del azoxystrobin sobre *Moniliophthora royeri*, agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*). *Rev. Mex. Fitopatol.* 31: 65-69.
- Velázquez-Ventura, J. C., C. Márquez-Quiroz, E. De la Cruz-Lázaro, R. Osorio-Osorio, and P. Preciado-Rangel. 2018. Morphological variation of wild peppers (*Capsicum* spp.) from the state of Tabasco, Mexico. *J. Food Agric.* 30: 115-121.
- Villamil, C. J. E., S. E. Viteri R., y W. L. Villegas O. 2015. Aplicación de antagonistas microbianos para el control biológico de *Moniliophthora royeri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. bajo condiciones de campo. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* 68: 7441-7450.

CARACTERÍSTICAS DE AGUAJES ARTIFICIALES Y SU RELACIÓN CON EL USO POR LA FAUNA SILVESTRE EN COAHUILA, MÉXICO

CHARACTERISTICS OF ARTIFICIAL WATER SOURCES AND ITS RELATIONSHIP WITH THE USE BY WILDLIFE IN COAHUILA, MEXICO

Norma Alejandra **Ovalle-Rivera**¹, Luis Antonio **Tarango-Arámula**^{1*}, Eloy Alejandro **Lozano-Cavazos**², Juan Felipe **Martínez-Montoya**¹, Genaro **Olmos-Oropeza**¹, Fernando **González-Saldívar**³, Saúl **Ugalde-Lezama**⁴

¹Colegio de Postgraduados. Campus San Luis Potosí. 78620. Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí. (Itarango@colpos.mx). ²Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Recursos Naturales Renovables. Calzada Antonio Narro núm. 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C.P. 25315. ³Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León. Linares Nuevo León Carretera Nacional #85, Km 145, Linares, Nuevo León, México. C.P. 67700. ⁴Suelos. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México.

RESUMEN

Con el fin de proveer agua a las especies de fauna silvestre de interés cinegético, la construcción de aguajes artificiales inició en las décadas de 1940 y 1950 por agencias estatales y federales de los Estados Unidos. Sin embargo, para su construcción y establecimiento no se consideran todos los factores que incrementen su uso por la fauna silvestre. El objetivo de este estudio fue relacionar la frecuencia del uso de los aguajes artificiales por la fauna silvestre con sus características físicas, temperatura, humedad relativa del área, calidad del agua y características de la vegetación circundante a éstos en la UMA Rancho San Juan, Monclova, Coahuila, México. En este estudio, aunque se considera que la localidad del agua, la temperatura y humedad son importantes, las características de la vegetación adyacente a los aguajes, es la que más influye en su uso por la fauna silvestre. La frecuencia de uso de los aguajes por la fauna silvestre se registró con cámaras trampa (HC500 HyperFire Semi-Covert IR de Reconyx, Wisconsin, USA). Para conocer cuáles de las variables estudiadas se asociaron más con la frecuencia de visitas se realizó una prueba de coeficiente de regresión *Poisson* en el software R-Studio, y para una visualización gráfica de esta asociación se realizó un análisis de correspondencias múltiples en el software Xlstat. Las especies que más utilizaron los aguajes fueron venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*, 32.8%), mapache (*Procyon lotor*, 18.9%) y pecarí (*Pecari tajacu*, 8.29%). De las 57 variables evaluadas, 11 se asociaron más con la frecuencia de visitas a los aguajes. El análisis

ABSTRACT

With the goal of providing water to wildlife species of hunting interest, the construction of artificial water sources began in the 1940s and 1950s by state and federal agencies of the United States. However, for their construction and establishment, not all the factors that increase its use by wildlife are considered. The objective of this study was to relate the frequency of use of artificial water sources by wildlife with their physical characteristics, temperature, relative humidity of the area, water quality and characteristics of the surrounding vegetation to these in UMA Rancho San Juan, Monclova, Coahuila, Mexico. In this study, even when it is considered that the water location, the temperature and the humidity are important, the characteristics of the vegetation adjacent to the water sources is what that influences most their use by wildlife. The frequency of use of water sources by wildlife was recorded with camera traps (HC500 HyperFire Semi-Covert IR of Reconyx, Wisconsin, USA). To understand which of the variables studied were most associated with the frequency of visits, a Poisson regression coefficient test was carried out with the R-Studio software; and for a graphic visualization of this association, a multiple correspondence analysis was performed in the Xlstat software. The species that used the artificial water sources most were white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*, 32.8%), raccoon (*Procyon lotor*, 18.9%) and peccary (*Pecari tajacu*, 8.29%). Of the 57 variables evaluated, 11 were associated more with the frequency of visits to the water sources. The multiple correspondence analysis identified that the width of the water source edge from 1 to 10 cm and the frequent presence of *Vachellia farnesiana* were the variables that related most with the category of high frequency of visits. These results

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: abril, 2020. Aprobado: junio, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 825-842. 2020.

de correspondencias múltiples identificó que el ancho del bordo de agujaje de 1 a 10 cm y la presencia frecuente de *Vachellia farnesiana* fueron las variables más relacionadas con la categoría de frecuencia de visitas alta. Estos resultados pueden ser útiles para entender mejor el uso de agujajes artificiales por la fauna silvestre y aumentar la probabilidad de su uso.

Palabras clave: calidad de agua, fauna silvestre, vegetación aledaña, *Vachellia farnesiana*, frecuencia de visitas.

INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso fundamental para los organismos y su distribución geográfica no es homogénea. Las especies de fauna silvestre que habitan en zonas áridas y semiáridas son las más afectadas por esta limitación (Simpson *et al.*, 2011). Durante las décadas de 1940 y 1950 en los Estados Unidos, la construcción de agujajes artificiales se inició para beneficiar a las especies de interés cinético (Simpson *et al.*, 2011). Los agujajes artificiales en ambientes áridos benefician a la fauna silvestre porque expanden su distribución, incrementan su productividad, mejoran la condición corporal y reducen la mortalidad, principalmente en época seca (Rosenstock *et al.*, 1999; Mandujano-Rodríguez y Hernández, 2019). Sin embargo, cuando su disponibilidad es alta, no hay diferencias en el comportamiento de la fauna silvestre ni por sexo ni en años secos (Bello *et al.*, 2001).

Especies de interés cinético usan los agujajes, así como especies de mamíferos, aves, reptiles e insectos; y este uso depende de la calidad de su agua y de la vegetación que los circunda (McKee *et al.*, 2015). Asimismo, algunas especies han desarrollado adaptaciones fisiológicas y comportamientos para minimizar su consumo (Gedir *et al.*, 2016). Sargeant *et al.* (2014) notaron que la cercanía de fauna silvestre a los agujajes naturales o artificiales depende de las características de la vegetación, clima, elevación o humedad del suelo; según Shields *et al.* (2012) éstos aumentan la depredación, competencia y favorecen la transmisión de enfermedades.

No obstante, su uso por la fauna silvestre depende entre otros factores, de las necesidades hídricas de las especies a beneficiar, volumen y calidad del agua disponible, distancia al terreno de escape, cobertura, ubicación y vegetación circundante (Larsen *et al.*, 2011). La calidad del agua subterránea utilizada

can be of use to better understand the use of artificial water sources by wildlife and possibly increase the probability of its use.

Keywords: water quality, wildlife, adjacent vegetation, *Vachellia farnesiana*, frequency of visits.

INTRODUCTION

Water is an essential resource for organisms and its geographic distribution is not homogeneous. Wildlife species that inhabit arid and semiarid zones are the most affected by this limitation (Simpson *et al.*, 2011). During the decades of the 1940s and 1950s in the United States, the construction of artificial water sources began in order to benefit game species (Simpson *et al.*, 2011). Artificial water sources in arid environments benefit wildlife because they expand their distribution, increase their productivity, improve the body condition, and reduce the mortality, mainly during the dry season (Rosenstock *et al.*, 1999; Mandujano-Rodríguez and Hernández, 2019). However, when their availability is high, there are no differences in terms of the behavior of wildlife species by sex or in dry years (Bello *et al.*, 2001).

Game species use water sources, as well as mammals, birds, reptiles and insects; and this use depends on the quality of water and the vegetation surrounding watering sites (McKee *et al.*, 2015). Likewise, some species have developed physiological adaptations and behaviors to minimize water consumption (Gedir *et al.*, 2016). Sargeant *et al.* (2014) noted that the proximity of wildlife to natural or artificial water sources depends on the characteristics of the vegetation, climate, elevation or humidity of the soil. Shields *et al.* (2012) pointed out that artificial water sources increase depredation, competition and that they favor the transmission of diseases.

However, their use by wildlife depend, among other factors, on the water needs of the species to benefit, the volume and quality of the water available, the distance to escape terrain, cover, location and surrounding vegetation (Larsen *et al.*, 2011). The quality of the underground water in the artificial water sources of the UMAs in northern Mexico can have negative effects on wildlife populations (Rosenstock *et al.*, 1999; Selebatso *et al.*, 2018). In this regard, Rosenstock *et al.* (1999) suggested that more research should be done to understand the

en los aguajes artificiales en las UMAs del norte de México, puede tener efectos negativos sobre las poblaciones de fauna silvestre (Rosenstock *et al.*, 1999; Selebatso *et al.*, 2018). Al respecto, (Rosenstock *et al.*, 1999) sugirieron que se investigue más sobre los efectos de las fuentes de agua artificial en relación con la distribución y el uso del hábitat por las especies cinegéticas y no cinegéticas, sobre las especies y tasas de depredación de los mamíferos; sobre la calidad del agua en aguajes construidos y fuentes naturales; sobre los efectos secundarios de los aguajes en las comunidades vegetales adyacentes y sobre el impacto de ellos en la transmisión de enfermedades.

Aunque la calidad del agua, la temperatura y humedad de un sitio determinado son importantes, nuestra hipótesis es que el uso de aguajes artificiales por la fauna silvestre depende más de las características de la vegetación contigua al aguaje; de modo que, el objetivo del estudio fue relacionar la frecuencia de uso de aguajes artificiales por la fauna silvestre con sus características físicas (dimensiones y diseño), temperatura, humedad relativa, calidad del agua (características químicas del agua), y características de la vegetación adyacente en la UMA-Rancho San Juan, Monclova, Coahuila, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de estudio

El estudio se realizó de septiembre de 2017 a septiembre de 2018 en la UMA-Rancho San Juan, (26° 50' 18.68" N, 101° 2' 31.22" O y 587 m de altitud) Monclova. El área comprende 3370 ha divididas en dos exclusiones: 1) San Juan con 2340 ha, y 2) San Vicente con 1030 ha. Esta UMA se dedica a actividades cinegéticas, el trofeo principal es el venado cola blanca (*O. virginianus texanus*). El clima es BS1hw (García, 2004) con temperatura media anual de 21.6 °C, 13.6 °C en el mes más frío y 29.8 °C en el mes más caliente y precipitación media total anual de 309.6 mm (SMN, 2018). Los tipos de vegetación dominante son matorrales desérticos rosetófilos y micrófilos (Rzedowski, 1978).

Aguajes artificiales

Veinte aguajes se eligieron al azar, 10 en cada sitio (San Juan y San Vicente) y con distancias entre ellos que variaron de 0.3 a 9.7 km (Figura 1). Los aguajes tienen dimensiones y formas distintas; 15 de ellos son cilíndricos y cinco en forma de cono,

effects of the artificial water sources in relation to the distribution and habitat use by game and non-game species; on the species and depredation rates of mammals; about water quality in artificial and natural water sources; about the secondary effects of water sources in the adjacent plant communities and about their impact on the transmission of diseases.

Although the water quality, the temperature and the humidity of a specific site are important, our hypothesis is that the use of artificial water sources by wildlife depends more on the characteristics of the vegetation adjacent to the water source; therefore, the objective of the study was to relate the frequency of use of artificial water sources by wildlife with their physical characteristics (dimensions and design), temperature, relative humidity, water quality (chemical characteristics of water), and characteristics of the adjacent vegetation in the UMA Rancho San Juan, Monclova, Coahuila, Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Location of the study area

The study was carried out from September 2017 to September 2018 at the UMA-Rancho San Juan, (26° 50' 18.68" N, 101° 2' 31.22" W and 587 m altitude), in Monclova. The area covers 3370 ha divided into two sections: 1) San Juan with 2340 ha, and 2) San Vicente with 1030 ha. This UMA is devoted to hunting activities, and the main trophy is white-tailed deer (*O. virginianus texanus*). The climate is BS1hw (García, 2004) with mean annual temperature of 21.6 °C, 13.6 °C in the coldest month and 29.8 °C in the warmest month, and mean total annual precipitation of 309.6 mm (SMN, 2018). The dominant vegetation types are rosetophyllous and microphyllous desert shrubs (Rzedowski, 1978).

Artificial water sources

Twenty water sources were chosen randomly, 10 in each site (San Juan and San Vicente) with distances between them that varied from 0.3 to 9.7 km (Figure 1). The water sources have different dimensions and shapes: 15 of them are cylindrical and five conical, and their capacity (volume) ranges from 1.3 to 18.4 m³; 18 are made of concrete; two are plastic. The diameter, depth and width of the edge were measured with a flex meter. None of the water sources have attachments to provide artificial shade, although the wildlife obtains sun protection from the tree species that surround them.

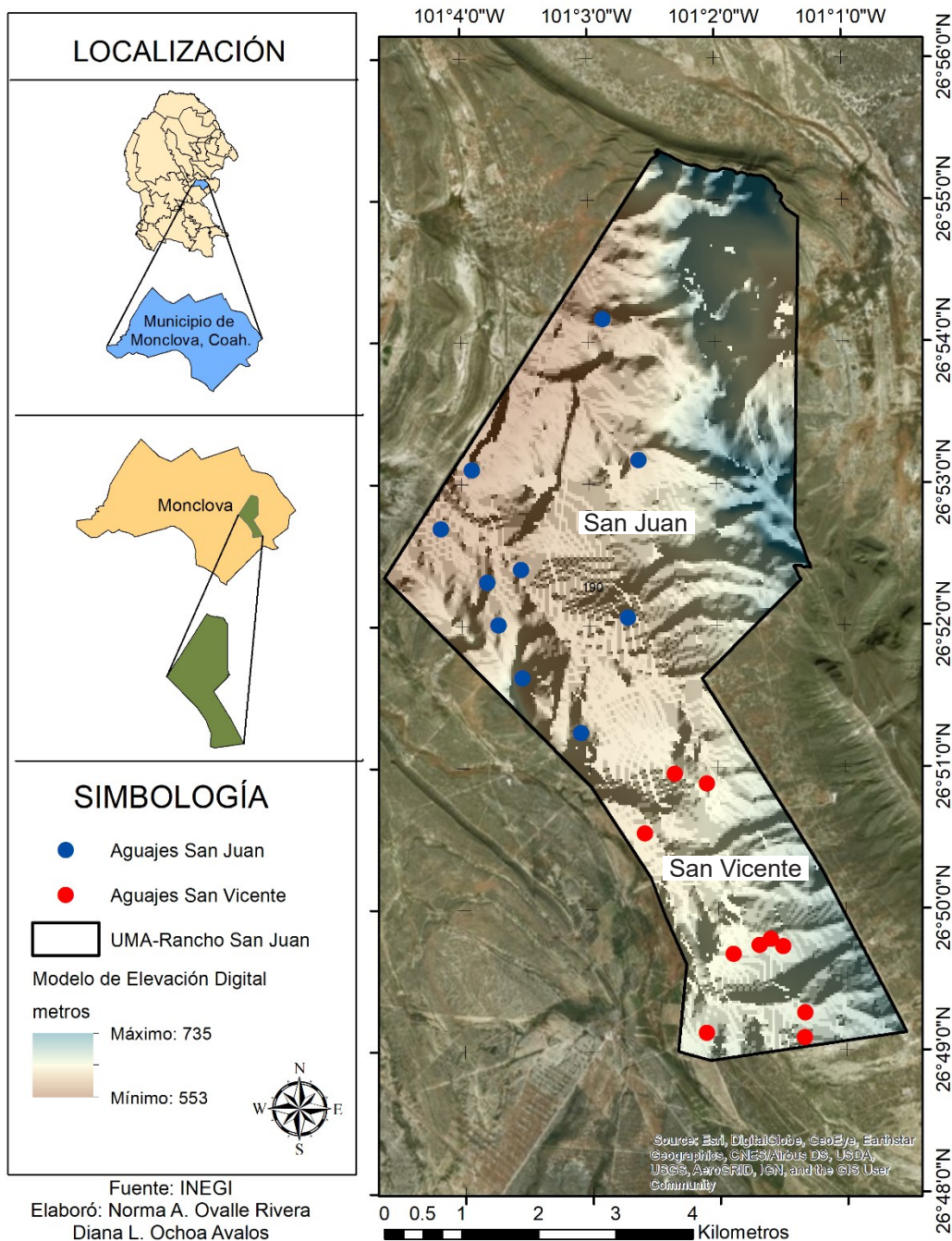


Figura 1. Localización del área de estudio y de los 20 aguajes artificiales estudiados por sitio (San Juan y San Vicente) en la UMA-Rancho San Juan, Coahuila, México (Ovalle-Rivera, 2019).

Figure 1. Location of the study area and the 20 artificial water sources studied by site (San Juan and San Vicente) in the UMA-Rancho San Juan, Monclova, Coahuila, Mexico (Ovalle-Rivera, 2019).

y su capacidad (volumen) varía entre 1.3 y 18.4 m³; 18 son de concreto; dos son de plástico. El diámetro, profundidad y ancho del bordo se midieron con un flexómetro. Ninguno de los aguajes tiene aditamentos para proporcionar sombra artificial, pero la

The wells used to fill these water sources are six, and the water is distributed by gravity. The water sources 1-2, 4-5 and 7-10 from the San Juan site are filled with well No. 4, the water sources 6 and 3 with the wells No. 5 and 6, respectively. Likewise,

fauna silvestre obtiene protección del sol por las especies arbóreas que los circundan.

La fuente de agua para el llenado de estos aguajes son seis pozos, el agua se distribuye por gravedad. Los aguajes 1-2, 4-5, y 7-10 del sitio San Juan, se llenan con el pozo No. 4, y los aguajes 6 y 3 con los pozos No. 5 y 6, respectivamente. Asimismo, los aguajes 1-10 del sitio San Vicente se llenan con los pozos No. 1, 2, y 3. Los aguajes se construyeron y se utilizan debido a la poca cantidad de lluvia en el área; su propósito principal es favorecer a las poblaciones de venado cola blanca, especie cinegética principal.

Frecuencia de visitas por fauna silvestre

En cada sitio se eligieron 10 aguajes al azar, en los cuales se colocó una cámara trampa (HC500 HyperFire Semi-Covert IR de Reconyx, Wisconsin, USA) con un sistema de detección de movimiento infrarrojo. Las cámaras estuvieron activas del 12 de septiembre de 2017 al 12 de septiembre de 2018 y se instalaron sobre postes de madera a una altura de 50 a 91 cm y una distancia al aguaje que varió de 1.5 a 5.30 m. La altura de la cámara y su distancia al aguaje, variaron en función del tamaño de cada uno de ellos. Las especies que usaron los aguajes artificiales se identificaron con las guías de campo, Field Guide to Birds of North America (Kaufman, 2005), Birds of México and Central America (Van Perlo, 2006), Aves de Coahuila (Garza de León, 2003) y Field Guide to Mammals of North America (Bowers *et al.*, 2004); además del sitio de internet Naturalista (CONABIO, 2019). La frecuencia de uso se clasificó por aguaje y por especie.

Calidad del agua

La calidad del agua de los aguajes artificiales se determinó según las concentraciones de arsénico (As), cadmio (Cd), cobre (Cu), hierro (Fe), plomo (Pb), mercurio (Hg), plata (Ag), zinc (Zn), nitrato (N_2NO_3), nitrito (N_2NO_2), cloruro (CL), sulfato (SO_4^{2-}) y sulfuro (SO^{2-}).

En octubre de 2018, cuatro muestras de agua por aguaje se recolectaron con distinto método de preservación según los iones a evaluar. Estos métodos fueron: 1) dos muestras de 500 mL; una para evaluar contenido de As, Cd, Cu, Fe, Pb, Hg, Ag y Zn y otra para determinar el contenido de CL^- , N_2NO_3 y SO_4^{2-} ; y 2) dos muestras de 100 mL cada una; una para determinar el contenido de N_2NO_2 a la cual se agregaron cuatro a 10 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) hasta alcanzar un pH de 2; la segunda fue para determinar el contenido de SO^{2-} a la cual se le agregaron cuatro gotas de acetato de zinc ($ZnC_4H_6O_4$) 2N y se envolvió en papel aluminio para evitar su contacto con la luz. Las cuatro muestras se refrigeraron hasta el momento de los análisis (DOF, 1992; DOF, 2001a; DOF, 2001b; DOF, 2008; DOF, 2014).

the water sources 1-10 from the San Vicente site are filled with wells No. 1, 2 and 3. The water sources were built and used due to the low amount of rainfall in the area, and their main purpose is to favor the populations of white-tailed deer, the main game species.

Frequency of visits by wildlife

In each site 10 water sources were chosen randomly, on which a camera trap was placed (HC500 HyperFire Semi-Covert IR from Reconyx, Wisconsin, USA) with an infrared movement detection system. The cameras were active from September 12, 2017, to September 12, 2018, and they were installed on wooden posts at a height of 50 to 91 cm and at a distance from the water source that ranged from 1.5 to 5.30 m. The height of the camera and its distance to the water source hole varied in function of the size of each of them. The species that made use of the artificial water sources were identified with the field guides: Field Guide to Birds of North America (Kaufman, 2005), Birds of Mexico and Central America (Van Perlo, 2006), Birds of Coahuila (Garza de León, 2003) and Field Guide to Mammals of North America (Bowers *et al.*, 2004), in addition to the Naturalista internet site (CONABIO, 2019). The frequency of use was classified by water source and by species.

Water quality

The water quality of artificial water sources was determined taking into account the concentrations of arsenic (As), cadmium (Cd), copper (Cu), iron (Fe), lead (Pb), mercury (Hg), silver (Ag), zinc (Zn), nitrate (N_2NO_3), nitrite (N_2NO_2), chlorine (CL^-), sulfate (SO_4^{2-}) and sulfide (SO^{2-}).

In October 2018, four samples of water per water source hole were collected with different preservation method depending on the ions to be evaluated. The methods were the following: 1) two samples were of 500 mL, one to evaluate content of As, Cd, Cu, Fe, Pb, Hg, Ag and Zn, and another to determine the content of CL^- , N_2NO_3 and SO_4^{2-} ; and 2) two samples were 100 mL each, one was used to determine the content of N_2NO_2 to which between four and 10 drops of sulfuric acid (H_2SO_4) were added until reaching a pH of 2. The second was to determine the content of SO^{2-} to which four drops of zinc acetate ($ZnC_4H_6O_4$) 2N were added, and it was wrapped in aluminum paper to avoid contact with light. The four samples were refrigerated until the analyses (DOF, 1992; DOF, 2001a; DOF, 2001b; DOF, 2008; DOF, 2014).

The contents of N_2NO_3 , N_2NO_2 , CL^- , SO_4^{2-} and SO^{2-} were quantified in the Environmental Chemical Engineering Laboratory of the School of Chemical Sciences of the Universidad Autónoma de San Luis Potosí, according to the Mexican Norms

Los contenidos de N_2NO_3 , N_2NO_2 , Cl^- , SO_4^{2-} y SO_3^{2-} se cuantificaron en el Laboratorio de Ingeniería Química Ambiental de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, de acuerdo con las Normas Mexicanas para Análisis de Agua correspondientes (DOF, 1992; DOF, 2001a; DOF, 2001b; DOF, 2008; DOF, 2014).

Los iones restantes (As, Cd, Cu, Fe, Pb, Hg, Ag y Zn) se analizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica, en el Laboratorio de Agua, Suelo y Planta del Colegio de Postgraduados Campus San Luis Potosí. La preparación de cada muestra consistió en eliminar la materia orgánica, agregar 2.5 mL de ácido nítrico concentrado a un matraz de 50 mL y aforar con la muestra. Las muestras se depositaron en tubos Falcon, los cuales se etiquetaron y se esterilizaron en una autoclave a 121 °C, 21 libras de presión por 15 min. Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica (Aurora Instruments, Modelo AI-1200, Serie 1200-050116) con los estándares de referencia comerciales de la marca Karal para las curvas de calibración, en las cuales se utilizaron de 5 a 7 puntos de calibración.

Vegetación

Las características de la vegetación circundante a los aguajes se determinaron en parcelas circulares de 7 m de radio (Solís y Gutiérrez, 1990), medidas desde la base periférica del aguaje. En cada uno de ellos se contaron los individuos de cada especie vegetal. A los individuos con altura igual o mayor a 2 m se les midió su diámetro mayor, menor y altura con una cinta métrica de 50 m (marca Truper). Además, cada especie vegetal se identificó con guías y claves especializadas (Alanís-Flores, 1996, Villarreal, 2001).

Análisis estadísticos

Para identificar diferencias significativas entre los iones medidos en el agua por aguaje, se usó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$) en el software InfoStat®. Y para conocer el grado de asociación entre la frecuencia de visitas por la fauna silvestre a los aguajes y las variables evaluadas (X_i ; $n=57$) se realizó un análisis de regresión Poisson. En el estudio se tomaron en cuenta 57 variables clasificadas así: 1) físicas del aguaje ($n=6$; diámetro, profundidad, capacidad-volumen, ancho del bordo, material de construcción y visibilidad); 2) temperatura ($n=8$; mínima y máxima por estación); 3) humedad relativa ($n=8$; mínima y máxima por estación); 4) calidad del agua ($n=13$; N_2NO_3 , N_2NO_2 , Cl^- , SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , As, Cd, Cu, Fe, Pb, Hg, Ag y Zn); y 5) vegetación ($n=22$; diámetro mayor, diámetro menor y altura de cada especie y la presencia de 19 especies vegetales).

Respecto a la identificación de cuáles variables evaluadas se asocian más con la frecuencia de uso de los aguajes por la fauna

for the corresponding water analysis (DOF, 1992; DOF, 2001a; DOF, 2001b; DOF, 2008; DOF, 2014).

The other ions (As, Cd, Cu, Fe, Pb, Hg, Ag and Zn) were analyzed in an atomic absorption spectrophotometer, in the Water, Soil and Plant Laboratory of Colegio de Postgraduados, Campus San Luis Potosí. The preparation of each sample consisted in eliminating the organic matter, adding 2.5 mL of concentrated nitric acid to a 50 mL flask and diluting with the sample. The samples were deposited in Falcon tubes, which were labeled and sterilized in an autoclave at 121 °C, 21 pounds of pressure for 15 min. The samples were analyzed in an atomic absorption spectrophotometer (Aurora Instruments, Model AI-1200, Series 1200-050116) with the commercial reference standards of the Karal brand for the calibration curves, in which 5 to 7 calibration points were used.

Vegetation

The characteristics of the vegetation adjacent to the water sources were determined in circular plots with 7 m radius (Solís and Gutiérrez, 1990), measured from the peripheral base of the water source. The individuals from each plant species were counted in each of them. Individuals with height equal or greater than 2 m were measured in their higher diameter, lower diameter and height with a measuring tape of 50 m (Truper brand). Likewise, each plant species was identified with specialized guides and keys (Alanís-Flores, 1996, Villarreal, 2001).

Statistical analyses

To identify the significant differences between the ions measured in the water per water source, a non-parametric Kruskal-Wallis test ($p \leq 0.05$) was used with InfoStat® software. And to understand the degree of association between the frequency of visits by wildlife to water sources and the variables evaluated, a Poisson regression analysis was conducted (X_i ; $n=57$). In the study 57 variables were taken into account classified as: 1) physical of the water sources ($n=6$; diameter, depth, capacity-volume, width of the edge, construction material and visibility); 2) temperature ($n=8$; minimum and maximum by station); 3) relative humidity ($n=8$; minimum and maximum by station); 4) water quality ($n=13$; N_2NO_3 , N_2NO_2 , Cl^- , SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , As, Cd, Cu, Fe, Pb, Hg, Ag and Zn); and 5) vegetation ($n=22$; higher diameter, lower diameter and height of each species, and presence of 19 plant species).

Regarding the identification of which of the variables evaluated are associated more with the frequency of use of water sources by the wildlife in the UMA Rancho San Juan, San Juan site and San Vicente site, a Poisson regression analysis was performed (González-Oreja, 2003), with generalized linear

silvestre en la UMA Rancho San Juan, sitio San Juan y sitio San Vicente, se realizó un análisis de regresión Poisson (González-Oreja, 2003), con modelos lineales generalizados; un procedimiento de selección de variables por pasos (stepwise) y, como medida de bondad de ajuste al modelo, el criterio del Mínimo Akaike; los coeficientes estadísticos significativos se obtuvieron con $p \leq 0.05$ [$\Pr(>|z|)$].

Para la representación gráfica de la relación entre la frecuencia de visitas y las variables que obtuvieron una asociación mayor en el análisis del coeficiente de regresión *Poisson*, se realizó un análisis de correspondencias múltiples (ACM). Para ello, cada variable se identificó con las dos primeras letras de su nombre y se clasificó con una letra b=bajo, m=medio o a=alto. Este análisis se realizó en el software Xlstat®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Frecuencia de visitas por fauna silvestre

En toda la UMA, se obtuvieron 23, 466 registros independientes y se identificaron 54 especies (14 especies de mamíferos y 40 especies de aves) que usan los aguajes artificiales. Las especies con mayor frecuencia de visitas a los aguajes artificiales fueron: venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*, 32.8%), mapache (*Procyon lotor*, 18.9%), pecarí (*Pecari tajacu*, 8.29%), zopilote aura (*Cathartes aura*, 6.3%), correcaminos (*Geococcyx californianus*, 5.8%), zorro gris (*Urocyon cinereoargenteus*, 3.7%), coyote (*Canis latrans*, 3.7%), huilota (*Zenaida macroura*, 3.5%), cuervo (*Corvux corax*, 3.0%) y codorniz escamosa (*Callipepla squamata*, 2.7%).

Para realizar el análisis de correspondencia, esta frecuencia de uso se agrupó por aguaje y se clasificó en tres categorías: 1) frecuencia alta (2401-3400), 2) frecuencia media (1401-2400) y frecuencia baja (400-1400).

Calidad del agua

En el área de estudio, las características químicas del agua en cada aguaje varían por la manera en que la fauna silvestre hace uso de ellos. Por ejemplo, es posible que los animales, además de consumir el agua, ingresen al aguaje para refrescarse y depositen heces y orina que contaminan el agua con patógenos (Umar *et al.*, 2014).

En este estudio, los contenidos de los iones evaluados en cada aguaje fueron distintos con excepción

de modelos; a stepwise variable selection procedure was done, and the Minimum Akaike criterion was used as a measure of goodness of fit to the model; the significant statistical coefficients were obtained with $p \leq 0.05$ [$\Pr(>|z|)$].

For the graphic representation of the relationship between the frequency of visits and the variables that obtained a higher association in the analysis of the Poisson regression coefficient, a multiple correspondence analysis (MCA) was carried out. For this purpose, each of the variables was identified with the first two letters of its name and classified with a letter b=low, m=medium, or a=high. This analysis was done with the Xlstat® software.

RESULTS AND DISCUSSION

Frequency of visits by wildlife

In the entire UMA, 23, 466 independent records were obtained and 54 species were identified (14 species of mammals and 40 species of birds) to use the artificial water sources. The species that had higher frequency of visits to the artificial water sources were: white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*, 32.8%), raccoon (*Procyon lotor*, 18.9%), peccary (*Pecari tajacu*, 8.29%), turkey vulture (*Cathartes aura*, 6.3%), roadrunner (*Geococcyx californianus*, 5.8%), grey fox (*Urocyon cinereoargenteus*, 3.7%), coyote (*Canis latrans*, 3.7%), mourning dove (*Zenaida macroura*, 3.5%), raven (*Corvux corax*, 3.0%) and scaled quail (*Callipepla squamata*, 2.7%).

To carry out the correspondence analysis, this frequency of use was grouped by water source and classified into three categories: 1) high frequency (2401-3400), 2) intermediate frequency (1401-2400) and low frequency (400-1400).

Water quality

In the study area, the chemical characteristics of water in each water source vary based on the way that wildlife makes use of them. For example, it is possible that animals, in addition to consuming water, enter the water source to cool down and deposit feces and urine that contaminate the water with pathogens (Umar *et al.*, 2014).

In this study, the contents of ions evaluated in each water source were different with exception of Hg (Table 1 and 2). The anions with greatest variation between sites and water sources were Cl⁻,

del Hg (Cuadro 1 y 2). Los aniones con variación mayor entre sitios y aguajes fueron Cl⁻, SO₄²⁻, SO₄²⁻, N₂-NO₃ y N₂-NO₂. Sin embargo, el análisis Kruskal-Wallis no indicó diferencias significativas (p=0.77) entre sus contenidos en el agua por aguaje.

En esta investigación, debido a que México no cuenta con normas que establezcan los parámetros de la calidad del agua para la fauna silvestre, para contrastar la calidad del agua se utilizaron las guías de campo usadas para evaluar la calidad del agua para ganado (Olkowski, 2009; Luque 2000). De acuerdo con Olkowski (2009) y Luque (2000), los contenidos de SO₄²⁻ (Cuadro 1) y Hg (Cuadro 2) rebasaron los límites permisibles.

Los contenidos de As, Cd, Hg, Cl⁻ y SO₄²⁻ sobrepasaron los límites permisibles en el agua de los aguajes artificiales. El arsénico provoca parálisis, convulsiones, diarreas, pérdida de apetito; el cadmio causa

SO₄²⁻, SO₄²⁻, N₂-NO₃ and N₂-NO₂. However, the Kruskal-Wallis analysis did not indicate significant differences (p=0.77) between the water contents per water source.

In this study, because Mexico does not have norms that establish the parameters of water quality for wildlife, to contrast water quality, field guides to evaluate the water quality for livestock were used (Olkowski, 2009; Luque 2000). According to Olkowski (2009) and Luque (2000), the contents of SO₄²⁻ (Table 1) and Hg (Table 2) exceeded the permissible limits.

The contents of As, Cd, Hg, Cl⁻ and SO₄²⁻ exceeded the permissible limits in the water of artificial water sources. Arsenic causes paralysis, convulsions, diarrhea, loss of appetite; cadmium causes anemia, abortions, birth defects, higher mortality. Mercury promotes ataxia, abnormal walk, muscular weakness,

Cuadro 1. Resultados de análisis de agua (mg L⁻¹) de los aguajes artificiales en la UMA-Rancho San Juan, Coahuila, México y límites permisibles (mg L⁻¹) en tres normas para ganado doméstico.

Table 1. Results from water analyses (mg L⁻¹) of artificial water sources in the UMA-Rancho San Juan, Monclova, Coahuila, Mexico and permissible limits (mg L⁻¹) in three norms for domestic livestock.

	Aguaje	Cl ⁻	Aniones medidos (mg L ⁻¹)			
			N ₂ -NO ₃	N ₂ -NO ₂	SO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
San Juan	1	510.28	14.86	0.05	1427	3.76
	2	226.38	6.31	0.01	627.2	0.96
	3	2687	19.14	0.04	3445	4
	4	53.81	3.55	0.06	300.5	0.4
	5	186.37	10.27	0.07	673.5	0.98
	6	343.93	8.71	0.05	1208.7	1.48
	7	173.96	9.53	0.01	654.5	0.41
	8	231.95	14.05	0.063	482	0.98
	9	347.92	14.3	0.025	656	0.88
	10	338.65	10.08	0.007	614	1.06
San Vicente	1	248.18	12.44	0.12	2576	1.2
	2	487.09	7.4	0.02	1594	0.88
	3	1971.57	40.37	0.035	4080	0.9
	4	672.65	11.3	0.034	3577	1.8
	5	960.27	8.63	0.006	1610	1.48
	6	1762.81	5.06	0.07	1497	0.5
	7	2041.15	5.75	0.035	2605	3.6
	8	120.61	3.18	0.03	361	0.3
	9	120.67	2.16	0.045	450	0.7
	10	294.58	9.38	0.042	1231.5	1.4
			Límites permisibles (mg L ⁻¹)			
	Puls (1988)	< 1000	†	†	< 500	†
	Luque (2000)	7000	100	10	1000	†
	Olkowski (2009)	†	23	3	1000	†

†Dato no disponible. ❖ Unavailable data.

Cuadro 2. Resultados de análisis de agua (mg L⁻¹) de los aguajes artificiales en la UMA-Rancho San Juan, Coahuila, México y sus límites permisibles (mg L⁻¹) en tres normas para ganado doméstico.
Table 2. Results from water analyses (mg L⁻¹) of artificial water sources in the UMA-Rancho San Juan, Monclova, Coahuila, Mexico, and their permissible limits (mg L⁻¹) in three norms for domestic livestock.

	Aguaje	Cationes medidos (mg L ⁻¹)							
		Ag	As	Cd	Cu	Fe	Hg	Pb	Zn
San Juan	1	0.236	0.206	0.064	1.4 E-5	0.035	0.031	0.009	0.018
	2	0.237	0.196	0.065	7.0 E-6	0.034	0.031	0.009	0.028
	3	0.236	0.206	0.073	2.1 E-5	0.034	0.031	0.01	0.028
	4	0.236	0.196	0.082	2.1 E-5	0.034	0.031	0.01	0.024
	5	0.24	0.199	0.06	7.0 E-6	0.034	0.031	0.009	0.026
	6	0.24	0.203	0.07	1.4 E-5	0.035	0.031	0.008	0.028
	7	0.242	0.206	0.079	4.2 E-5	0.034	0.031	0.008	0.025
	8	0.239	0.203	0.059	5.6 E-5	0.035	0.031	0.008	0.024
	9	0.236	0.196	0.068	5.6 E-5	0.035	0.031	0.009	0.027
	10	0.237	0.206	0.054	2.1 E-5	0.035	0.031	0.009	0.026
San Vicente	1	0.237	0.243	0.057	7.0 E-6	0.035	0.031	0.009	0.026
	2	0.237	0.266	0.056	2.8 E-5	0.034	0.031	0.009	0.047
	3	0.237	0.219	0.066	6.3 E-5	0.036	0.031	0.009	0.032
	4	0.238	0.216	0.075	3.5 E-5	0.037	0.031	0.009	0.025
	5	0.237	0.243	0.06	< al LC	0.034	0.031	0.009	0.025
	6	0.237	0.153	0.069	< al LC	0.034	0.031	0.009	0.026
	7	0.237	0.323	0.077	7.0 E-6	0.034	0.031	0.009	0.025
	8	0.237	0.183	0.067	5.6 E-5	0.034	0.031	0.009	0.024
	9	0.237	0.206	0.065	4.2 E-5	0.034	0.031	0.009	0.025
	10	0.237	0.209	0.071	1.4 E-5	0.034	0.031	0.009	0.026
		Límites permisibles (mg L ⁻¹)							
Puls (1988)	†	< 0.05	< 0.01	< 1.0	< 0.04	†	< 0.05	< 5.0	
Luque (2000)	†	0.15-0.20	†	†	†	0.01	†	†	
Olkowski (2009)	0.05 [‡]	0.025	0.08	0.5-5.0	†	0.03	0.1	50	

†Dato no disponible; ‡Límite permisible recomendado para caballos. ♦ †Unavailable data; ‡ Permissible limit recommended for horses.

anemia, abortos, nacimientos con defectos, aumento de mortalidad. El mercurio promueve la ataxia, marcha anormal, debilidad muscular, temblores; y el sulfato provoca un consumo de agua reducido (Puls, 1988; NRC, 2007).

De los 13 iones medidos, cinco sobrepasan los límites permisibles (As, Cd, Hg, Cl⁻ y SO₄²⁻) en algunos aguajes y a pesar de no existir diferencias significativas entre los contenidos de estas variables químicas en toda la UMA, el agua proveniente de los pozos 2, 3 y 6 presentó los contenidos de As, Cd, Hg, Cl⁻ y SO₄²⁻ mayores. Sin embargo, en aguajes naturales y artificiales del Desierto Sonorense en el sureste de Arizona y California (Rosenstock *et al.*, 2005) y sureste de California, EUA (Bleich *et al.*, 2006), así como en aguajes naturales de Baja California, México

tremors; and sulfate provokes a reduced water consumption (Puls, 1988; NRC, 2007).

Of the 13 ions measured, five exceed the permissible limits (As, Cd, Hg, Cl⁻ and SO₄²⁻) in some water sources and although no significant differences were found between the contents of these chemical variables in the entire UMA, the water from wells 2, 3 and 6 presented the highest contents of As, Cd, Hg, Cl⁻ and SO₄²⁻. However, in natural and artificial water sources of the Sonoran Desert in southeastern Arizona and California (Rosenstock *et al.*, 2005) and southeastern California, USA (Bleich *et al.*, 2006), as well as in natural water sources in Baja California, Mexico (Escobar-Flores *et al.*, 2016), the water quality components did not represent a risk for the health of wildlife.

(Escobar-Flores *et al.*, 2016), los componentes de la calidad del agua no representaron riesgo para la salud de la fauna silvestre.

Vegetación

En la UMA - Rancho San Juan se encontraron 19 especies vegetales. De ellas, 17 se localizaron en el sitio San Juan y 15 en San Vicente. Algunas especies solo se encontraron en alguno de los dos sitios (Cuadro 3). En San Juan las especies más frecuentes fueron sangre de drago y mezquite, en San Vicente el maguey, lechuguilla, hojaseñ y chaparro prieto, y en toda la UMA fueron el maguey lechuguilla, sangre de drago y mezquite.

De las especies vegetales circundantes a los aguajes, el mezquite y chaparro prieto proporcionan protección y echaderos para venados (Mandujano *et al.*, 2014); el cenizo, la gobernadora, algunas especies del género *Vachellia* spp. y *Opuntia* spp. (Olivas-Sánchez *et al.*, 2015) forman parte de su dieta. Larsen *et al.* (2011) recomiendan que en la construcción de aguajes artificiales se considere la especie a beneficiar y la vegetación circundante.

Vegetation

In the UMA - Rancho San Juan, 19 plant species were found; of these, 17 were located in the San Juan site and 15 in San Vicente. Some species were only found in one of the two sites (Table 3).

In San Juan, the most frequent species were *sangre de drago* and mesquite, in San Vicente maguey, *lechuguilla*, *hojaseñ* and *chaparro prieto*, and in the entire UMA, maguey *lechuguilla*, *sangre de drago* and mesquite.

Of plant species surrounding the water sources, mesquite and *chaparro prieto* provide protection and resting areas for deer (Mandujano *et al.*, 2014); *cenizo*, *gobernadora*, some species of the genus *Vachellia* spp. and *Opuntia* spp. (Olivas-Sánchez *et al.*, 2015) are part of deer diet. Larsen *et al.* (2011) recommend that prior to the construction of artificial water sources, the species to benefit and the surrounding vegetation need to be considered.

Poisson regression coefficient

The Poisson regression analysis (PRA) for the UMA Rancho San Juan identified an association

Cuadro 3. Frecuencia relativa de especies vegetales que circundan los aguajes artificiales por sitio (San Juan y San Vicente) y en la UMA - Rancho San Juan, Coahuila, México.

Table 3. Table 3. Relative frequency of plant species adjacent to the artificial water sources per site (San Juan and San Vicente) and in the UMA - Rancho San Juan, Monclova, Coahuila, Mexico.

Nombre científico	Nombre común	Frecuencia relativa		
		San Juan	San Vicente	UMA
<i>Prosopis glandulosa</i> Torr.	Mezquite	19.27	8.31	11.9
<i>Rhamnus humboldtiana</i> (Schult.) Zuc.	Cacachila	2.79	0.82	1.47
<i>Larrea tridentata</i> (Moç. y Seseé ex DC.) Coville	Gobernadora	7.82	0.82	3.11
<i>Vachellia farnesiana</i> (L.) Wight y Arn.	Huizache	1.4	1.91	1.74
<i>Opuntia rastrera</i> F.A.C. Weber	Nopal rastrero	13.69	4.22	7.33
<i>Agave lechuguilla</i> Torr.	Maguey lechuguilla	11.17	37.33	28.75
<i>Jatropha dioica</i> Sessé ex Cerv.	Sangre de drago	30.73	8.31	15.66
<i>Aloysia gratissima</i> (Gillies y Hook.) Tronc	Vara dulce	1.12	6.13	4.49
<i>Atriplex canescens</i> (Pursh) Nutt.	Cenizo	0.28	0	0.09
<i>Tamarix gallica</i> Linneo	Taray	1.96	0	0.64
<i>Schinus molle</i> Linneo	Pirul	0	0.27	0.18
<i>Fouquieria splendens</i> Engelm	Ocotillo	0.56	0	0.18
<i>Cylindropuntia leptocaulis</i> (DC.) F.M.Knuth	Tasajillo	1.68	0	0.55
<i>Euphorbia antisiphilitica</i> Zucc.	Candelilla	0.56	0.54	0.55
<i>Flourensia cernua</i> DC.	Hojaseñ	0.56	11.31	7.78
<i>Vachellia rigidula</i> (Benth.) Seigler y Ebinger	Chaparro prieto	0	10.49	7.05
<i>Yucca</i> sp. Linneo	Yucca	4.75	0.68	2.01
<i>Agave</i> sp. Linneo	Agave	0.84	2.04	1.65
<i>Mammillaria</i> sp. Haw.	Biznagas	0.84	0.14	0.37

Coefficiente de regresión Poisson

El análisis de regresión Poisson (ARP) identificó para la UMA Rancho San Juan una asociación entre la frecuencia de visitas (Y) con 11 de las 57 variables evaluadas (Cuadro 4) y un valor de ajuste al modelo (AIC)=216.35. Las tres primeras variables fueron presencia de huizache, lechuguilla y altura de la vegetación circundante.

En el sitio San Juan la frecuencia de visitas se asoció con seis variables de las 57 variables evaluadas, con un (AIC=590.88). Las tres con mayor relevancia fueron también huizache, lechuguilla y la altura de la vegetación circundante (Cuadro 5).

En el sitio San Vicente la frecuencia de visitas a los aguajes artificiales se asoció con siete de las 57 variables evaluadas y un valor de ajuste al modelo

between the frequency of visits (Y) with 11 of the 57 variables evaluated (Table 4) and an adjustment value to the model (AIC)=216.35. The first three variables were presence of sweet acacia, *lechuguilla* and height of the surrounding vegetation.

In the San Juan site, the frequency of visits was associated to six variables of the 57 variables evaluated, with an AIC=590.88; the three with highest relevance were also sweet acacia, *lechuguilla* and height of the surrounding vegetation (Table 5).

In San Vicente site, the frequency of visits to artificial water sources was associated with seven of the 57 variables evaluated and an adjustment value to the model (AIC=110.71). As in the entire UMA and the San Juan site, the three main variables were the presence of sweet acacia, *lechuguilla* and height of the surrounding vegetation (Table 6).

Cuadro 4. Resultados del ARP para la asociación entre la frecuencia de visitas por la fauna silvestre a los aguajes artificiales y 11 variables evaluadas en la UMA Rancho San Juan, Coahuila, México.

Table 4. Results from the PRA for the association between the frequency of visits by wildlife to artificial water sources and 11 variables evaluated in the UMA Rancho San Juan, Monclova, Coahuila, Mexico.

Variables	Estimado	Error estándar	Valor z	Pr(> z)
(Intercepto)	-207.854	5.369	-38.71	<2e-16
<i>Vachellia farnesiana</i>	8.942	0.302	29.61	<2e-16
<i>Agave lechuguilla</i>	-0.860	0.022	-38.74	<2e-16
Altura de la vegetación circundante	51.599	1.365	37.81	<2e-16
Ancho de bordo del aguaje	-223.850	6.026	-37.15	<2e-16
Arsénico	825.880	22.249	37.12	<2e-16
Cadmio	1829.987	45.727	40.02	<2e-16
Cloruros	0.010	0.000	34.61	<2e-16
Diámetro del aguaje	-7.366	0.234	-31.44	<2e-16
Diámetro mayor de las especies vegetales	-6.811	0.161	-42.29	<2e-16
Diámetro menor de las especies vegetales	-1.182	0.042	-28.45	<2e-16
Hierro	-4839.110	134.764	-35.91	<2e-16

Cuadro 5. Resultados del ARP entre la frecuencia de visitas por la fauna silvestre a los aguajes artificiales y seis variables evaluadas en el sitio San Juan, Coahuila, México.

Table 5. Results of the PRA between the frequency of visits by wildlife to artificial water sources and six variables evaluated in the San Juan site, Monclova, Coahuila, Mexico.

Variables	Estimado	Error estándar	Valor z	Pr(> z)
(Intercepto)	-8.4794475	0.5336126	-15.891	< 2e-16
<i>Vachellia farnesiana</i>	0.0437803	0.0154629	2.831	0.00464
<i>Agave lechuguilla</i>	-0.0060367	0.0009289	-6.499	8.11E-11
Altura de la vegetación Circundante	0.7699156	0.0433338	17.767	< 2e-16
Ancho del bordo del aguaje	-5.2920553	0.3875362	-13.656	< 2e-16
Arsénico	53.5221313	2.466268	21.702	< 2e-16
Cadmio	51.9474357	1.6052422	32.361	< 2e-16

Cuadro 6. Resultados del ARP entre la frecuencia de visitas por la fauna silvestre a los aguajes artificiales y siete variables evaluadas en el sitio San Vicente, Coahuila, México.**Table 6. Results of the PRA between the frequency of visits of wildlife to artificial water sources and seven variables evaluated in the San Vicente site, Monclova, Coahuila, Mexico.**

Variables	Estimado	Error estándar	Valor z	Pr(> z)
(Intercepto)	-21.24801	0.71179	-29.851	< 2e-16
<i>Vachellia farnesiana</i>	0.08249	0.01661	4.965	6.856E-07
<i>Agave lechuguilla</i>	0.03027	0.00156	19.402	< 2e-16
Altura de la vegetación Circundante	0.18863	0.03368	5.601	2.13E-08
Ancho del bordo del aguaje	-7.79855	0.34525	-22.588	< 2e-16
Arsénico	126.61556	3.52293	35.94	< 2e-16
Capacidad del aguaje (volumen)	0.32092	0.01531	20.958	< 2e-16
Cadmio	31.28166	1.67903	18.631	< 2e-16

(AIC=110.71). Al igual que en toda la UMA y sitio San Juan, las tres variables principales fueron la presencia de huizache, lechuguilla y la altura de la vegetación circundante (Cuadro 6).

En este estudio, la frecuencia de visitas mayor a los aguajes correspondió al venado cola blanca (*O. virginianus*), mapache (*P. lotor*), pecarí (*P. tajacu*), zopilote aura (*C. aura*) y correcominos (*G. californianus*). La frecuencia de uso por el venado es probable que se relacione con la presencia del huizache en la vegetación circundante, porque esa especie forma parte de su dieta (Olivas-Sánchez *et al.*, 2015).

La variable altura de la vegetación se relaciona con el grado de visibilidad para las especies que utilizan los aguajes artificiales en el área de estudio. Al respecto, la cantidad y calidad de la vegetación cercana a los aguajes, son determinantes en el uso de ellos (Mckee *et al.*, 2015).

El contenido de As también se relacionó con la frecuencia de visitas. Este mineral, en algunos casos, sobrepasó los límites permisibles, lo que puede provocar afectaciones en la salud de los animales (Puls, 1988).

Análisis de correspondencias múltiples

El análisis de regresión Poisson (ARP) señaló la asociación de la frecuencia de visitas con 11 de las 57 variables evaluadas en el área de estudio (Cuadro 7). Para realizar el análisis de correspondencias múltiples (ACM), estas variables se identificaron y clasificaron en tres niveles de frecuencia (alto, medio o bajo).

El análisis de correspondencias múltiples (ACM), para la UMA, señaló una asociación entre

In the study, the highest frequency of visits to water sources corresponds to the white-tailed deer (*O. virginianus*), raccoon (*P. lotor*), peccary (*P. tajacu*), turkey vulture (*C. aura*) and roadrunner (*G. californianus*). The frequency of use by deer is probably related to the presence of sweet acacia in the surrounding vegetation, because this species is part of their diet (Olivas-Sánchez *et al.*, 2015).

The variable of height of the vegetation is related to the degree of visibility for the species that use artificial water sources in the study area. In this regard, it has been shown that the amount and the quality of the vegetation near the water sources are decisive in their use (Mckee *et al.*, 2015).

The content of As is also related to the frequency of visits. This mineral, in some cases, exceeded the permissible limits, which can cause affectations in the health of animals (Puls, 1988).

Multiple correspondence analysis

The Poisson regression analysis (PRA) pointed the association of the frequency of visits with 11 of the 57 variables evaluated in the study area (Table 7). To carry out the multiple correspondence analysis (MCA), these variables were identified and classified in three levels of frequency (high, medium or low).

The multiple correspondence analysis (MCA) for the UMA identified an association between the high frequency of visits (2401=3400 visits) and the width of the water source edge low, and in lower proportion with the low diameter of the water source. The medium frequency of visits (1401-2400) was related to low presence of *lechuguilla*, high presence

Cuadro 7. Variables asociadas a la frecuencia de visitas de fauna silvestre a los aguajes artificiales en la UMA Rancho San Juan, Coahuila, México, con sus abreviaturas por niveles e identificación en el ACM.

Table 7. Variables associated to the frequency of visits of wildlife to artificial water sources in the UMA Rancho San Juan, Monclova, Coahuila, Mexico, with their abbreviations by levels of identification in the MCA.

Variable	Niveles		
	Alto	Medio	Bajo
Frecuencia de visitas	Freca	frecm	frecb
<i>Vachellia farnesiana</i>	vacfara	vacfarm	vacfarb
<i>Agave lechuguilla</i>	agaleca	agalecm	agalecb
Diámetro mayor de la vegetación	dmmaa	dmmam	dmmab
Diámetro menor de la vegetación	dmmea	dmmem	dmmeb
Altura de la vegetación	alta	altm	altb
Diámetro del aguaje	diaa	diam	diab
Ancho del bordo del aguaje	anbora	anborm	anborb
Capacidad del aguaje (volumen)	capa	capm	capb
Arsénico (As)	asa	asm	asb
Cadmio (Cd)	cda	cdm	cdb
Hierro (Fe)	fea	fem	feb
Cloruros (Cl ⁻)	clora	clorm	clorb

Freca = frecuencia alta (2401-3400); Frecm = frecuencia media (1401-2400); Frecb = frecuencia baja (400-1400). ♦ Freca = high frequency (2401-3400); Frecm = medium frequency (1401-2400); Frecb = low frequency (400-1400).

la frecuencia de visitas alta (2401=3400 visitas) y el ancho de bordo del aguaje bajo y en menor proporción con el diámetro del aguaje bajo. La frecuencia de visitas media (1401-2400) se relacionó con la presencia de lechuguilla baja, presencia de huizache alta y diámetro de aguaje alto. Por último, cuando se presentó una frecuencia de visitas baja (400-1400), esta se asoció con la presencia de huizache baja y el contenido de cadmio medio (Figura 2).

En San Juan, con el ACM se encontró que la frecuencia de visitas alta (2401-3400) se relacionó con el ancho de bordo del aguaje bajo. En los aguajes donde se registró una frecuencia de visitas media (1401=2400), esta se asoció con el contenido de As bajo y la presencia de huizache baja. La frecuencia de visitas baja (400-1400) se relacionó con el de Cd bajo y la presencia de lechuguilla baja (Figura 3).

En San Vicente no se registró frecuencia de visitas alta, por lo que en el ACM sólo se observa la conformación de dos grupos (frecuencia de visitas media y baja). La frecuencia de visitas media (1401-2400) se relacionó con el ancho de bordo medio y la frecuencia de visitas baja (400-1400) se asoció con contenido de Cd medio y con la presencia de huizache baja (Figura 4).

of sweet acacia, and high diameter of water source. Lastly, when a low frequency of visits (400-1400) was found, it was associated with the low presence of sweet acacia and the medium content of cadmium (Figure 2).

In San Juan, with the MCA it was found that the high frequency of visits (2401-3400) was related to the width of the water source low. In the water sources where a medium frequency of visits (1401-2400) was found, it was related to the low content of As and the low presence of sweet acacia. The low frequency of visits (400-1400) was associated to low Cd and low presence of *lechuguilla* (Figure 3).

In San Vicente a high frequency of visits was not found; for this reason, in the MCA only the conformation of two groups is observed (medium and low frequency of visits). The medium frequency of visits (1401-2400) was associated to the medium width of the edge and the low frequency of visits (400-1400) was associated to medium content of Cd and low presence of sweet acacia (Figure 4).

The variables that were associated with the frequency of visits were classified into: 1) physical characteristics of the water source (dimension and design), 2) adjacent vegetation, and 3) water quality.

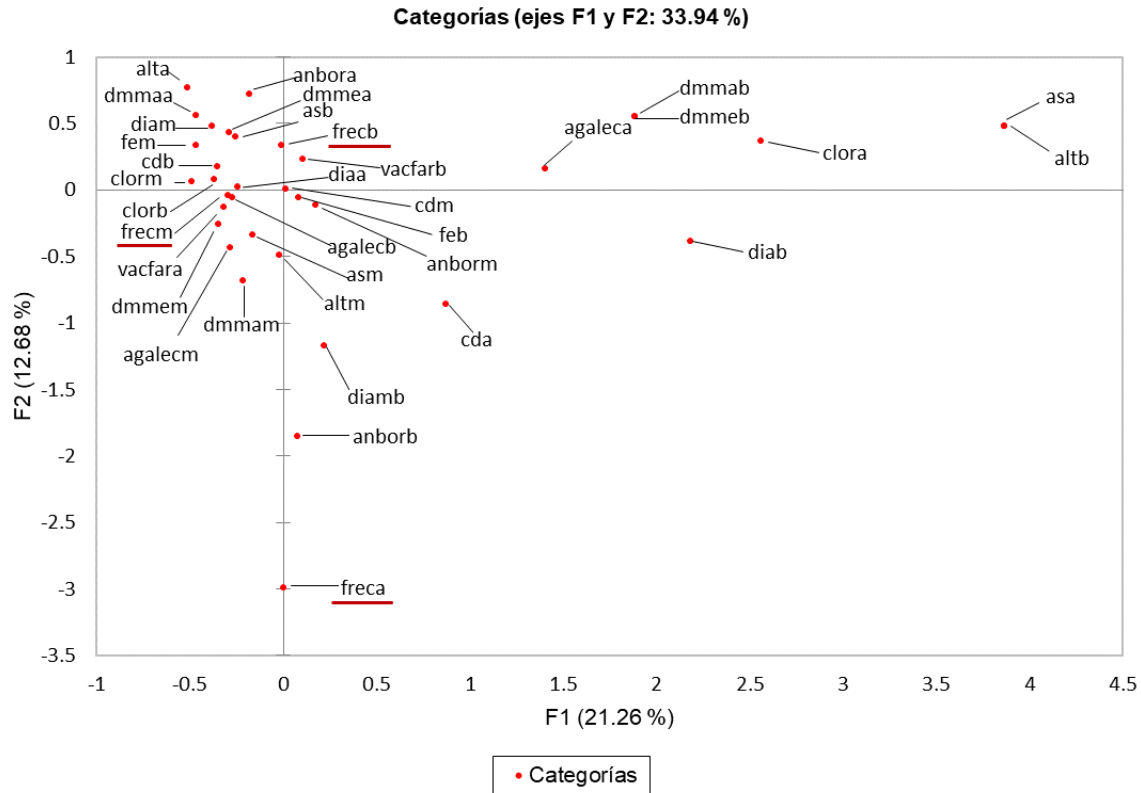


Figura 2. Resultado del ACM (Análisis de Correspondencias Múltiples) donde se observan las variables más relacionadas con la frecuencia de visitas por la fauna silvestre a los agujeros artificiales en la UMA Rancho San Juan, Coahuila, México.
Figure 2. Result of the MCA (Multiple Correspondence Analysis) where the variables most related to the frequency of visits by wildlife to artificial water sources are shown for the UMA Rancho San Juan, Monclova, Coahuila, Mexico.

Las variables relacionadas con la frecuencia de visitas se clasifican en: 1) características físicas del agujero (dimensión y diseño), 2) vegetación aledaña, y 3) calidad del agua. La variable borde del agujero pertenece al grupo 1, y esta se relacionó en sus niveles bajo (1-10 cm) y medio (11-20 cm) con la frecuencia de visitas alta y media, respectivamente; y el diámetro del borde (3-9 m) con la frecuencia de visitas media. Esto puede indicar que la fauna silvestre usó más los agujeros en función de su acceso a los mismos; si embargo, su utilización se mantiene.

En cuanto a las variables de la vegetación aledaña, la frecuencia de visitas se relacionó con la presencia de huizache y a mayor presencia de esta planta, la frecuencia de visitas fue mayor. Este comportamiento sugeriría que la frecuencia de visitas aumenta en función de la cantidad de vegetación que rodea a los agujeros (Lynn *et al.*, 2006). La calidad del agua es un factor controversial; aunque no está comprobado que

The variable edge of the water source belongs to group 1, and it was related in its low (1-10 cm) and medium (11-20) levels to high and medium frequency of visits, respectively, and the diameter of the edge (3-9 m) with medium frequency of visits. This could indicate that wildlife used water sources more depending on access to them.

Regarding the variables of the surrounding vegetation, we found that the frequency of visits was related to the presence of sweet acacia: the greater the presence of this plant, the greater the frequency of visits. This behavior would suggest that the frequency of visits increases in function of the amount of vegetation that surrounds the water sources (Lynn *et al.*, 2006). The quality of the water is a controversial factor, although it has not been proven that it is related to the use of the water source or with disease or wildlife mortality events (Simpson *et al.*, 2011). In this study, two elements with low intervals of

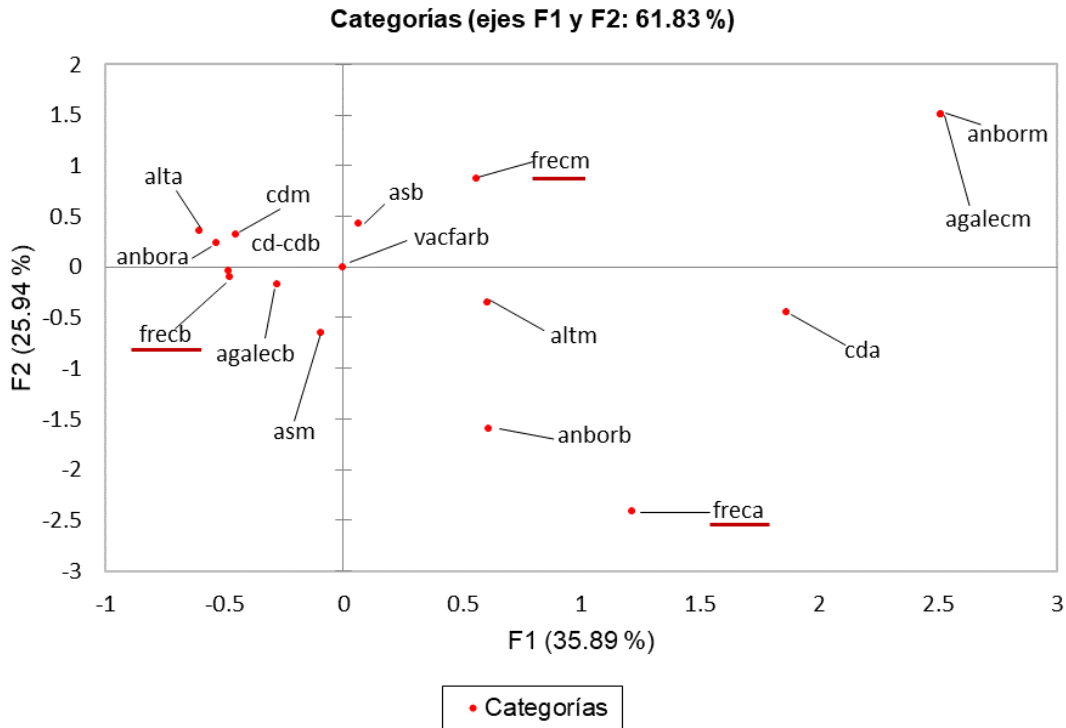


Figura 3. Resultado del ACM (Análisis de Correspondencias Múltiples donde se observan las variables más relacionadas con la frecuencia de visitas por la fauna silvestre a los aguajes artificiales del sitio San Juan, Coahuila, México.
Figure 3. Result from the MCA (Multiple Correspondence Analysis) where the variables most related with the frequency of visits by wildlife to artificial water sources are shown for the San Juan site, Monclova, Coahuila, Mexico.

se relacione con el uso del aguaje o con eventos de enfermedad o mortalidad de fauna silvestre (Simpson *et al.*, 2011). En este estudio, dos elementos con intervalos de concentración bajos, As (0.10 - 0.20 mg L⁻¹) y Cd (0.05 - 0.06 mg L⁻¹), tuvieron relación con la frecuencia de visitas media y baja. Al comparar estos intervalos de contenido de As y Cd con la norma correspondiente, se encontró que el As está por debajo y el Cd por encima de los límites permisibles. La frecuencia de visitas fue menor cuando el agua presentó contenidos de elementos superiores a los límites permisibles.

CONCLUSIONES

Los aguajes artificiales de la UMA Rancho San Juan fueron más visitados por los mamíferos venado cola blanca, mapache y pecarí y las aves zopilote aura y correcaminos. Las concentraciones de arsénico, cadmio, mercurio, cloro y sulfato en el agua de los aguajes sobrepasaron los niveles máximos permisibles; esto indica que el agua de algunos de los aguajes

concentración, As (0.10 - 0.20 mg L⁻¹) and Cd (0.05 - 0.06 mg L⁻¹), had a relationship with the medium and low frequency of visits. When comparing these intervals of As and Cd content with the corresponding norm, it was found that As is under and Cd is over the permissible limits. The frequency of visits was lower when the water presented contents of elements higher than the permissible limits.

CONCLUSIONS

The artificial water sources of the UMA Rancho San Juan were visited the most by mammals, white-tailed deer, raccoon and peccary; and by birds, turkey vulture and roadrunner. The concentrations of arsenic, cadmium, mercury, chlorine and sulfate in the water of the water sources exceeded the maximum permissible levels. This indicates that the water of some of the water sources is not apt for consumption by wildlife; however, it is still being used.

The vegetation adjacent to the water sources was made up mostly by *Jatropha dioica*, *Agave lechuguilla*

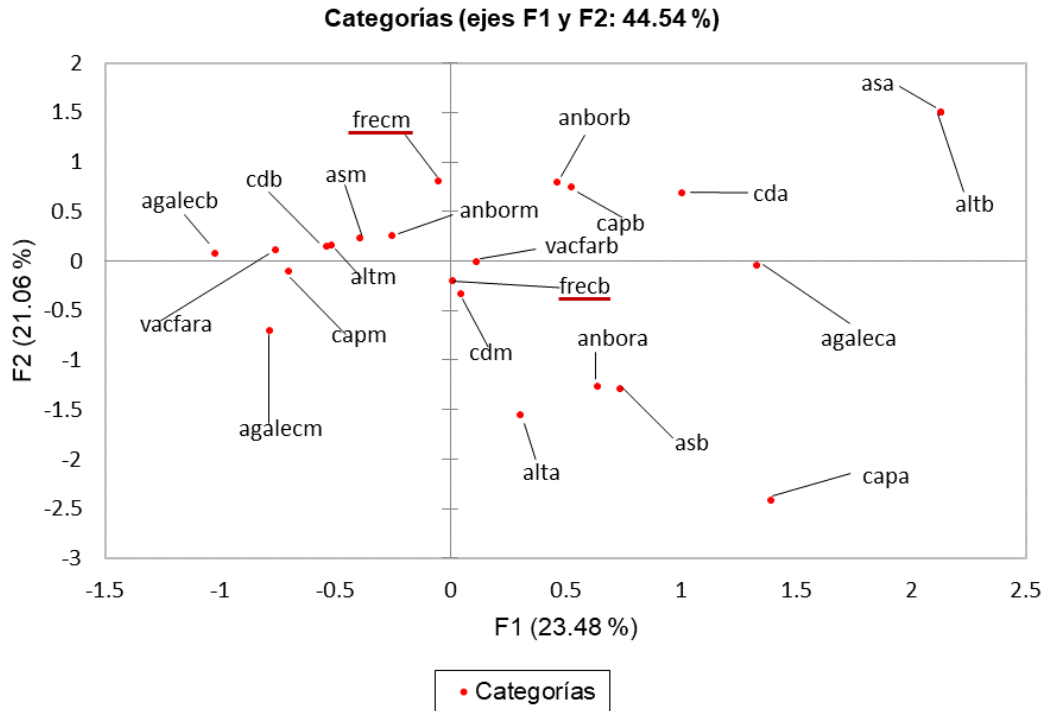


Figura 4. Resultado del ACM (Análisis de Correspondencias Múltiples) donde se observan las variables más relacionadas con la frecuencia de visitas por la fauna silvestre a los aguajes artificiales del sitio San Vicente, Coahuila, México.

Figure 4. Results from the MCA (Multiple Correspondence Analysis) where the variables most related with the frequency of visits by wildlife to artificial water sources are shown for the San Vicente site, Monclova, Coahuila, Mexico.

no es apta para su consumo por la fauna silvestre; sin embargo, su uso se mantiene.

La vegetación circundante a los aguajes se compuso en su mayoría de *Jatropha dioica*, *Agave lechuguilla* y *Prosopis glandulosa*. El uso mayor de aguajes artificiales en la Unidad de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre San Juan en Coahuila, se asoció con cinco variables de la vegetación, dos características físicas de los aguajes y cuatro variables del contenido de elementos en el agua. La frecuencia de visitas alta se relacionó más con el ancho de borde entre 1 y 10 cm, la presencia alta de *Vachellia farnesiana* y los niveles bajos de arsénico y cadmio.

Los aguajes deben construirse para que los utilicen la mayor cantidad de especies de fauna silvestre. Estos deben tener rampas, visibilidad y cobertura vegetal adecuada; con especies vegetales circundantes que sean consumidas por la fauna silvestre; y debe darse seguimiento sistemático a la calidad del agua, en especial los niveles de arsénico y cadmio, así como y la calidad del agua en los aguajes del área de

and *Prosopis glandulosa*. The higher use of artificial water sources in the Management Unit for Wild Life Conservation San Juan in Coahuila, Mexico, was associated with five variables of the vegetation; two physical characteristics of the water sources and four variables of the content of elements in the water. The high frequency of visits was related more with the width of the edge between 1 and 10 cm, the high presence of *Vachellia farnesiana* and the low levels of arsenic and cadmium.

The water sources must be built for them to be used by the highest number of wildlife species. These must have ramps, visibility and adequate plant cover; with surrounding plant species that are consumed by wildlife; and systematic monitoring must be given to the water quality, especially to the levels of arsenic and cadmium, as well as to the quality of the water in the water sources are filled in the study area. The characterization of the vegetation adjacent to the water sources ought to be performed in circular plots of larger size.

estudio. La caracterización de la vegetación aledaña a los aguajes debería realizarse en parcelas circulares de tamaño mayor.

LITERATURA CITADA

- Alanís-Flores G.J. 1996. Vegetación y Flora de Nuevo León, una Guía Botánico-Ecológica. Impresora Monterrey, S.A. de C.V. San Nicolás de los Garza, N.L. 251 p.
- Bello, J., S. Gallina, M. Equihua, S. Mandujano, and C. Delfin. 2001. Activity areas and distance to water sources by white-tailed deer in Northeastern Mexico. *Vida Silvestre Neotrop.* 10:30-37.
- Bleich, V. C., N. G. Andrew, M. J. Martin, G. P. Mulcahy, A. M. Pauli, and S. S. Rosenstock. 2006. Quality of water available to wildlife in desert environments: comparisons among anthropogenic and natural sources. *Wildlife Soc. Bull.* 34: 627-632.
- Bowers, N., R. Bowers, and K. Kaufman. 2004. *Field Guide to Mammals of North America*. New York: Houghton Mifflin. 351 p.
- CONABIO (Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad). 2019. Base de datos NaturaLista. <https://www.naturalista.mx/> (Consulta: enero, 2019).
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 1992. Contaminación del agua-Determinación de nitrógeno de nitrato - Método espectrofotométrico ultravioleta. NMX-AA-082-1986. <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/aa/aa082.pdf> (Consulta: septiembre 2018).
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2001a. Análisis de agua-Determinación de cloruros totales en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba. NMX-AA-073-SCFI-2001. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166789/NMX-AA-073-SCFI-2001.pdf> (Consulta: septiembre 2018).
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2001b. Determinación de nitratos en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas - Método de prueba. NMX-AA-079-SCFI-2001. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166794/NMX-AA-079-SCFI-2001.pdf> (Consulta: septiembre 2018).
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2008. Análisis de agua. Determinación de sulfuros en aguas naturales y residuales - Método de prueba. NMX-AA-084-2008. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166796/NMX-AA-084-1982.pdf> (Consulta: septiembre 2018).
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2014. Análisis de agua-Medición del ion sulfato en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba. NMX-AA-074-SCFI-2014. Recuperado de: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166149/nmx-aa-074-scfi-2014.pdf> (Consulta: septiembre 2018).
- Escobar-Flores, J. G., R. Valdez, S. Álvarez-Cárdenas, S. Díaz-Castro, A. Castellanos-Vera, J. Torres, y M. Delgado-Fernández. 2016. Utilización de aguajes por el borrego cimarrón (*Ovis canadensis cremnobates*) y análisis de calidad del agua en Sierra Santa Isabel, Baja California, México. *Acta Universitaria* 26: 12-19.
- García, E. 2004. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen (5ta ed.). México: Instituto de Geografía UNAM. pp: 63-73.
- Garza de León, A. 2003. Aves de Coahuila. Guía de campo. México: Agisa. 373 p.
- Gedir, J. V., J. W. Cain, P. R. Krausman, J. D. Allen, G. C. Duff, and J. R. Morgart. 2016. Potential foraging decisions by a desert ungulate to balance water and nutrient intake in a water-stressed environment. *PLOS ONE* 11:1-20.
- Kaufman, K. 2005. *Guía de Campo a las Aves de Norteamérica*. Houghton Mifflin. 392 p.
- Larsen, R. T., J. A. Bissonette, J. T. Flinders, and A. C. Robinson. 2011. Does small-perimeter fencing inhibit mule deer or pronghorn use of water developments? *J. Wildlife Manage.* 75: 1417-1425.
- Luque, J. L. 2000. Calidad de agua para bebida de animales. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. 25 p.
- Lynn, J. C., C. L. Chambers, and S. S. Rosenstock. 2006. Use of wildlife water developments by birds in Southwest Arizona during migration. *Wildlife Soc. Bull.* 34: 592 - 601.
- Mandujano, S., S. Gallina, y J. A. Ortega. 2014. Venado cola blanca en México. *In: Valdez, R. y J. A. Ortega. Ecología y Manejo de Fauna Silvestre en México. Colegio de Postgraduados. México, DF. pp: 413 - 434.*
- Mandujano-Rodríguez, S y C. Hernández. 2019. Uso de bebederos artificiales por venado cola blanca en una UMA extensiva en la Reserva de la Biósfera Tehuacan-Cuicatlán, México. *AgroProductividad* 12:37-42.
- McKee, C. J., K. M. Stewart, J. S. Sedinger, A. P. Bush, N. W. Darby, D. L. Hughson, and V. C. Bleich. 2015. Spatial distributions and resource selection by mule deer in an arid environment: Responses to provision of water. *J. Arid Environ.* 122: 76 - 84.
- NRC (National Research Council). 2007. *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids*. The National Academies Press. Washington D.C. 353 p.
- Olivas-Sánchez, M. P., C. Vital-García, J. P. Flores-Márquez, M. Quinonez-Martínez, y F. Clemente-Sánchez. 2015. Cambios estacionales en la dieta del Venado bura (*Odocoileus hemionus* Crooki) en matorral desértico chihuahuense. *AgroProductividad*. 8: 59-64.
- Olkowski, A. A. 2009. *Livestock water quality: A Field Guide for Cattle, Horses, Poultry and Swine*. Agriculture and Agri-Food Canada. 157 p.
- Ovalle-Rivera, N. A. O. 2019. Uso de aguajes artificiales por venado cola blanca (*Odocoileus virginianus texanus* Zimmermann) y fauna silvestre asociada en la UMA-Rancho San Juan, Coahuila, México. *Colegio de Postgraduados Campus San Luis Potosí*. 67 p.
- Puls, R. 1988. *Mineral Levels in Animal Health*. Diagnostic Data. Sherpa International, Clearbrook, British Columbia, Canada. 240 p.
- Rosenstock S. S., W. B. Ballard, and J. C. De Vos. 1999. Viewpoints. Benefits and impacts of Wildlife water developments. *J. Range Manage.* 53: 302-311.
- Rosenstock, S. S., V. C. Bleich, M. J. Rabe, and C. Reggiardo. 2005. Water quality at wildlife water sources in the Sonoran Desert, United States. *Range. Ecol. Manage.* 58: 623-627.

- Rzedowski J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México, D.F. 504 p.
- Sargeant, G. A., M. W. Oehler, and C. L. Sexton. 2014. Use of water developments by female elk at Theodore Roosevelt National Park, North Dakota. *California Fish and Game* 100: 538-549.
- Selebatso, M., G. Maude, and R. W. Fynn. 2018. Assessment of quality of water provided for wildlife in the Central Kalahari Game Reserve, Botswana. *Physics Chem. Earth. Parts A/B/C.* 105: 191-195.
- Shields, A. V., R. T. Larsen, and J. C. Whiting. 2012. Summer watering patterns of mule deer in the Great Basin Desert, USA: Implications of differential sex by individuals and the sexes for management of water resources. *The Sci. World J.* 2012: 1 – 9.
- Simpson, N. O., K. M. Stewart, and V. C. Bleich. 2011. What have we learned about water developments for wildlife? Not enough! *California Fish and Game* 97:190 – 209.
- SMN (Sistema Meteorológico Nacional). 2018. Información Estadística Climatológica <https://smn.cna.gob.mx/es/climatologia/informacion-climatologica/informacion-estadistica-climatologica> (Consulta: octubre, 2018).
- Solís D.M., and R. J. Gutiérrez. 1990. Summer habitat ecology of Northern spotted owls in Northwestern California. *The Condor* 92:739-748. DOI: <https://doi.org/10.2307/1368693>.
- Umar, S., M. T. Munir, T. Azeem, S. Ali, W. Umar, A. Rehman, and M.A. Shah. 2014. Effects of water quality on productivity and performance of livestock: A mini review. *Veterinaria* 2: 11-15.
- Van Perlo, B. 2006. *Birds of Mexico and Central America*. Princeton University Press. 336 p.
- Villarreal, J. Á. 2001. *Flora de Coahuila. Listados florísticos de México*. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 136 p.